

Déborah Carolina Batista Lopes da Cunha Matias

Papel do fator de transcrição NFAT1 na regulação da Ciclina E em linfócitos B

Dissertação de candidatura ao grau de **Mestre em Oncologia** – Especialização em Oncologia Molecular submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador: Doutor João Paulo de Biaso Viola

Pesquisador Titular - Programa de Biologia Celular, Coordenação de Pesquisa (CPQ), Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

Coorientador: Doutor Leonardo Augusto Karam Teixeira

Pesquisador Adjunto - Programa de Biologia Celular, Coordenação de Pesquisa (CPQ), Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus que guiou os meus passos até aqui e foi o responsável por cada conquista.

Agradeço ao meu orientador, Dr. João Paulo de Biaso Viola que me acolheu no seu grupo de investigação e me orientou da melhor forma.

Agradeço ao meu coorientador, Dr. Leonardo Teixeira Karam, que me instruiu cientificamente durante todo o processo, esclareceu as minhas dúvidas sempre que precisei e me ajudou sempre em todos os sentidos.

Agradeço à professora Berta, atual Diretora do Mestrado, e a todos os demais docentes, por nos terem dado esta oportunidade e por terem partilhado connosco seu conhecimento em Oncologia.

Agradeço ao Ministério da Saúde, à CNPq e à FAPERJ pelo apoio financeiro indispensável ao projeto.

Agradeço aos meus colegas de grupo que criaram um ambiente fantástico e presentearam com sugestões científicas de alto valor.

Agradeço à minha família e amigos pelo apoio sem o qual eu não teria chegado até aqui.

Resumo

A família dos fatores de transcrição NFAT (Nuclear Factor of Activated T Cells) é constituída por quatro proteínas reguladas pela via de Cálcio/Calcineurina (NFAT1-4) e pelo NFAT5 que é regulado por osmose. É bastante conhecido o papel do NFAT na regulação da expressão de citocinas durante a resposta imune de linfócitos T. Recentemente, tem sido demonstrado que esses fatores de transcrição também estão relacionados com a regulação de genes que controlam o ciclo celular, a diferenciação celular e a apoptose em outros tipos celulares. O envolvimento dos fatores de transcrição NFAT nesses processos sugere que a sua atividade está relacionada com a transformação celular. Contudo, o papel do fator de transcrição NFAT1 no controle da proliferação de linfócitos B é pouco conhecido. O objetivo deste trabalho é analisar o papel do NFAT1 na regulação das Ciclinas E1 e E2 em linfócitos B. Neste estudo foi possível determinar seis sítios putativos de ligação para os fatores de transcrição NFAT nos promotores proximais de ambas as ciclinas humanas. Os resultados de Imunoprecipitação de Cromatina (ChIP) indicam que NFAT1 é capaz de se ligar na região entre as posições -869 a -616 pb do promotor de Ciclina E1, nos sítios -829, -765, -752 e -677 pb e na região entre as posições -696 a -522 pb do promotor de Ciclina E2, nos sítios -695 e -658 pb, em células Raji estimuladas. Além disso, os resultados de ChIP indicam que o promotor de Ciclina E1 é mais acessível do que o promotor de Ciclina E2 em células Raji estimuladas. O conjunto de resultados sugere que o fator de transcrição NFAT1 pode regular diretamente a expressão de Ciclina E em linfócitos B.

Abstract

The NFAT (Nuclear Factor of Activated T Cells) family of transcription factors contains four proteins regulated by the Calcium/Calcineurin signaling pathway (NFAT1-4) and NFAT5 that is activated by osmosis. It is widely known the role of NFAT in regulation of cytokine expression during immune cell responses of T lymphocytes. Recently, it has been shown that these transcription factors are also related to the regulation of genes that control cell cycle, cell differentiation, and apoptosis in other cell types. The involvement of NFAT transcription factors in these processes suggests that their activity is related to cell transformation. However, the role NFAT1 transcription factor in B cell proliferation remains elusive. The aim of this work is to analyze the role of NFAT1 in Cyclin E1 and E2 regulation in B lymphocytes. In this study we determined six putative binding sites for NFAT transcription factors in the proximal promoters of both human cyclins. Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) results indicate that NFAT1 is able to bind to the Cyclin E1 promoter in the region between -869 to -616 bp, at the positions -829, -765, -752 and -677 bp and to the Cyclin E2 promoter in the region between -696 to -522 bp, at the positions -695 and -658 bp in stimulated Raji cells. Moreover, ChIP results indicate that Cyclin E1 promoter is more accessible than Cyclin E2 promoter in stimulated Raji cells. The set of results suggests that NFAT1 transcription factor may directly regulate Cyclin E expression in B lymphocytes.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1 Resposta Imune.....	1
1.1.1 Ativação de Linfócitos B.....	2
1.1.2 Imunidade tumoral	3
1.1.3 A família dos fatores de transcrição NFAT	4
1.2 Regulação do Ciclo Celular.....	8
1.2.1 Ciclinas	8
1.2.2 Envolvimento do NFAT no controle do Ciclo Celular	12
1.2.3 Envolvimento do NFAT na regulação da transformação celular	12
1.2.4 Envolvimento do NFAT na regulação da transformação de linfócitos B	13
2. Objetivos.....	15
2.1 Objetivos específicos	15
3. Materiais e Métodos.....	17
3.1 Células, Meios e Reagentes	17
3.2 Ensaio de Imunoprecipitação de Cromatina (ChIP)	17
3.3 Extração de DNA	19
3.4 Análise Bioinformática.....	19
3.5 PCR em Tempo Real	20
4. Resultados.....	21
5. Discussão	39
6. Conclusão e Perspectivas Futuras	43
7. Referências.....	45

1. Introdução

1.1 Resposta Imune

O sistema imune é o conjunto de células e moléculas responsáveis pela conservação da homeostasia tecidual e pela manutenção do próprio, através do reconhecimento de padrões de injúria celular. Diferentes células participam da ativação do sistema imune. É necessário que haja diferenciação de células tronco hematopoiéticas na medula óssea e proliferação das células efetivas para desencadear a resposta imune. O descontrole dessa resposta pode dar origem a diversas doenças [1].

As células tronco hematopoiéticas vão originar precursores mielóides e linfóides. Os precursores mielóides vão se diferenciar em plaquetas, eritrócitos, mastócitos, granulócitos (neutrófilos, basófilos e eosinófilo) e monócitos (que vão se diferenciar em macrófagos e células dendríticas). Por sua vez, os precursores linfóides vão se diferenciar em linfócitos T (no Timo), em linfócitos B e em células NK (*Natural Killer*) [2].

Os macrófagos e os neutrófilos possuem receptores (PRRs) que reconhecem diferentes ligandos que possuem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Essas células fagocitam os antígenos e produzem citocinas inflamatórias, providenciando a primeira linha de defesa, rápida e pouco específica, contra os microorganismos. As células NK fazem parte dessa primeira resposta, uma vez que são citotóxicas e produtoras de interferon-gama (IFN- γ), responsáveis pela endocitose das células fagocitárias. O sistema complemento, também responsável pela lise e fagocitose das células fagocitárias, por exemplo, os macrófagos, também faz parte da resposta imune inata [3].

A resposta inata é importante para iniciar e direcionar a resposta adaptativa uma vez que os PAMPs vão induzir a produção de citocinas, que mediam a resposta inflamatória, e sinais coestimulatórios [4]. A resposta adaptativa, de grande especificidade, é induzida essencialmente por células dendríticas que ingerem os agentes patogênicos e os apresentam a linfócitos T. Essas células apresentam o antígeno no contexto de MHC (*Major Histocompatibility Complex*) para os linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺, promovendo a ativação destas células [5]. Contudo, o sinal recebido pelo receptor do linfócito T não é suficiente para ativá-lo, os coestímulos induzidos pelos PAMPs são necessários para que haja ativação dos linfócitos T e consequente ativação de clones que reconheçam especificamente os antígenos. As células apresentadoras de antígenos são estimuladas por ligantes dos receptores TLR (*Toll-like Receptors*) e

expressão moléculas coestimulatórias [6]. Além disso, as citocinas induzidas também ativam linfócitos B que secretam anticorpos que também vão atuar na resposta imune [4].

1.1.1 Ativação de Linfócitos B

Os linfócitos B são células do sistema imune adaptativo que expressa os seus receptores (BCRs) na membrana celular. As células B se desenvolvem de células tronco hematopoiéticas, iniciam seu processo de diferenciação na medula óssea e passam por dois tipos de seleção. Se não houver ligação de um antígeno a célula não recebe sinais para se desenvolver (seleção negativa). Por outro lado, se o antígeno se ligar ao pre-BCR e ao BCR a célula vai continuar o seu desenvolvimento na medula óssea (seleção positiva). As células B vão migrar para os órgãos linfóides secundários, como baço e linfonodo, e sofrer diferenciação, passando a ser consideradas células B maduras ou *naive* [7] [8].

As células B são ativadas quando um antígeno livre na corrente sanguínea, se ligam ao receptor BCR, levando à ativação de diferentes vias de sinalização intracelular [9]. A presença de citocinas neste microambiente, juntamente com o sinal desencadeado pela ligação do antígeno ao BCR e a ativação do coreceptor de células B: CD21/CD19/CD81 vai estimular as células B maduras a proliferarem e se diferenciarem em células produtoras de imunoglobulinas [10] [11].

As células T ajudam as células B na resposta imune, quando as células B apresentam um antígeno às células T *helper*, o reconhecimento do antígeno pela célula T faz com que esta seja ativada, por sua vez as células B recebem sinais coestimulatórios e são ativadas. Na verdade, as células B se ligam ao antígeno através do seu receptor de membrana, imunoglobulina, e degradam o antígeno. De seguida, apresentam os peptídeos a moléculas MHC de classe II, por fim, as células T reconhecem os peptídeos processados e ocorre, então, a ativação mútua das células B e T [12].

As células B que receberam ajuda das células T e foram selecionadas vão entrar na zona escura dos centros germinativos nos linfonodos, sofrer hipermutação somática e vão proliferar. Após um ciclo, as células B vão migrar para a zona clara dos centros germinativos e os seus BCRs serão expostos a antígenos apresentados por células dendríticas foliculares. Se a afinidade dos BCRs for baixa, as células B vão sofrer apoptose, as células B restantes vão receber sinais de sobrevivência e vão competir pelas células T *helper* limitantes. As células B com BCRs de menor afinidade vão sofrer

apoptose e as células com BCRs de elevada afinidade podem voltar a entrar na zona escura dos centros germinativos e sofrer hipermutação somática e proliferação. As células B selecionadas também podem se diferenciar em plasmócitos ou células B de memória e sair dos centros germinativos [13].

1.1.2 Imunidade tumoral

O cancro é uma das doenças mais incidentes e uma das principais causas de morte por doença a nível mundial, revelando-se um grande problema de saúde pública. A tumorigénese é o processo que decorre da acumulação de sucessivas alterações genéticas e epigenéticas que não são reparadas e transformam uma célula normal em neoplásica, ou seja, uma célula que prolifera descontroladamente e apresenta um alto potencial de migração e invasão [14]. Segundo Hanahan e Weinberg uma célula transformada não depende de estímulos de crescimento celular e é insensível a sinais inibitórios de crescimento. Além disso, consegue escapar à apoptose e possui potencial replicativo ilimitado. A célula cancerígena também possui angiogénese sustentada e potencial invasivo e metastático [14]. Contudo, para gerar doença, as células transformadas necessitam escapar do sistema imune.

Ao longo dos anos tem sido discutido como o sistema imune pode detetar e eliminar essas células alteradas, uma vez que estas expressam proteínas anormais, ou níveis anormais de proteínas que podem funcionar como um antígeno tumoral. Tem sido demonstrado que a imunidade possui tanto uma função protetora contra o desenvolvimento do cancro, como também pode promover o crescimento tumoral [15].

O conceito de vigilância imunológica foi desenvolvido por Lewis Thomas e Frank Burnet. Ambos concordavam que o sistema imunológico tem a capacidade de reconhecer e de destruir células malignas [16]. Estudos posteriores suportam a teoria imunovigilância, tem sido demonstrado que imunodeficiências primárias, ou seja, causadas por defeitos genéticos, estão associadas a um risco aumentado no desenvolvimento do cancro [17] [18], apesar de não se saber exatamente o que leva a esse aumento. Por exemplo, pacientes com deficiência na imunidade humoral, possuem aumento na incidência de linfomas e de alguns tumores epiteliais [19] [20]. Além disso, a imunodeficiência causada por algumas infeções virais também aumenta o risco de desenvolver cancro. O vírus HIV (*human immunodeficiency virus*) causa imunodeficiência nos indivíduos porque mata seletivamente as suas células TCD4⁺. Um estudo *cohort* mostra que indivíduos infetados com o vírus HIV têm um risco elevado de desenvolver

cancros associados a vírus oncogénicos. Por exemplo, um dos cancros desenvolvidos por esses indivíduos é o Sarcoma de Kaposi, um tumor do endotélio linfático, associado ao vírus da herpes VHH-8 ou KSHV (*Kaposi's sarcoma herpes virus*). Os linfomas de Hodgkin e Não-Hodgkin associados ao vírus EBV (*Epstein Barr Virus*), os cancros cervical, anal e do colo do útero associados ao HPV (Human Papiloma Virus) e o cancro do fígado associado ao vírus de hepatite B e C são outros exemplos de cancros frequentemente relacionados com a síndrome da imunodeficiência adquirida [21]. Também tem sido demonstrado que pacientes que sofrem transplante de órgão e precisam de tratamento com drogas imunossupressoras, por exemplo, a ciclosporina A, estão mais propensos a desenvolver diversos tipos de cancro, tais como cancro no lábio, pele (não melanoma), rim, glândulas endócrinas, colo do útero e linfoma Não-Hodgkin [22]. Outro dado que suporta a hipótese da imunovigilância é que os tumores sólidos são infiltrados por várias células do sistema imune e que o tipo, a densidade e a localização dessas células imunes podem influenciar na sobrevivência dos indivíduos [23]. Por exemplo pacientes com cancro colorretal com um número maior de células T CD3⁺ intratumorais têm uma maior sobrevida [24]. Por último, as células cancerígenas acumulam seletivamente mutações para evadir à destruição imunológica. Frequentemente, essas células mutam genes do complexo MHC de classe I, de modo a evitar que sejam reconhecidas e eliminadas pelas células T CD8⁺, uma vez que estas células são ativadas por péptidos apresentados por esse complexo [25].

Os tumores podem ser classificados de acordo com o tipo de tecido em que são originados. Linfomas são tumores de um tipo específico de células do sistema imune, os linfócitos, que têm origem nos linfonodos ou em tecidos do sistema linfático. Existem dois principais grupos, os linfomas de Hodgkin e Não-Hodgkin, sendo os últimos mais comuns. Existem vários tipos de linfomas de células B, o DLBCL (*Diffuse large B-cell lymphomas*) é o linfoma Não-Hodgkin mais comum [26].

1.1.3 A família dos fatores de transcrição NFAT

A família do fator de transcrição NFAT (*Nuclear factor of activated T cells*) consiste em cinco proteínas, NFAT1, NFAT2, NFAT3, NFAT4 e NFAT5. Os primeiros quatro membros, NFAT1-4, são regulados por sinais de cálcio. As proteínas estão fosforiladas e inativas no citoplasma, quando a célula é estimulada há uma indução do influxo de cálcio e consequente ativação da calcineurina fosfatase, uma serina/treonina fosfatase, que desfosforila o NFAT. Este sofre translocação para o núcleo, onde vai formar

heterodímeros ou associar-se a parceiros e regular a expressão genética (Figura 1) [27]. A ativação das proteínas NFAT1-4 é sensível aos inibidores de calcineurina e aos imunossupressores ciclosporina A e FK506 [28]. O NFAT5 é expresso em quase todas as células e é regulado por osmose [29] [30].

As proteínas NFAT têm um domínio de ligação ao DNA altamente conservado entre si, localizado aproximadamente entre os aminoácidos 400 e 700, conhecido como *REL-homology region (RHR)*, que confere uma especificidade de ligação ao DNA comum e caracteriza a família NFAT. As proteínas NFAT também têm um domínio moderadamente conservado, chamado *NFAT-homology region (NHR)*, um domínio regulatório de ativação, localizado na região N-terminal. As proteínas NFAT contêm domínios de transativação (TAD) tanto na região N-terminal, como na região C-terminal. NFAT1-4 têm várias isoformas que diferem tanto na região N-terminal, como na C-terminal. As proteínas NFAT interagem com diversos outros fatores de transcrição, por exemplo com as proteínas AP-1 (Fos/Jun), formando complexos estáveis, a fim de regular a expressão de diversos genes e estabilizar a interação NFAT-DNA. Outros fatores de transcrição descritos como parceiros de NFAT na regulação da transcrição são as proteínas MAF e GATA (por exemplo, GATA-3) [27] [31] [30] [32] [33].

O primeiro membro da família NFAT a ser descrito foi o NFAT1, em células T Jurkat, como um fator nuclear que se liga ao promotor de IL-2 humano [34]. NFAT1 é a proteína predominante e é expressa em linfócitos T periféricos após a estimulação do receptor de células T. NFAT1 induz alterações na expressão de diversas citocinas, incluindo IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 e IFN- γ [35] [36]. A proteína NFAT2 foi clonada de uma célula T Jurkat e também regula a expressão de IL-2. Essa proteína é expressa em tecidos linfóides periféricos e está sobrerregulada em células T ativadas e em Células NK [37]. Apesar de NFAT ter sido descrito primeiro em células T, as proteínas dessa família são expressas em outras células imunes e não imunes. NFAT1 e 2 estão presentes em células B e desempenham um importante papel na sua ativação e diferenciação. Esses membros também são encontradas em mastócitos e células NK [7] [38] [39] [37]. Quanto a NFAT4, está descrito que é expressa em baixos níveis nos tecidos linfóides periféricos e é altamente expressa no timo, sugerindo que essa proteína está envolvida na diferenciação de timócitos [40] [41].

É amplamente conhecido o papel da família NFAT na regulação da expressão de citocinas [1] e no controle da diferenciação de células T. De facto, sítios de ligação para as proteínas NFAT estão presentes em promotores de diversas citocinas, como IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-13, IFN- γ , TNF- α e GM-CSF [27] [42], [30]. Foi determinado que a sequência consenso de ligação do NFAT é 5' - (A/T)GGAAA(A/N)(A/T/C)N -3' (N representa qualquer nucleotídeo) [27] [43].

O fator de transcrição NFAT também está envolvido na regulação da apoptose. A expressão de moléculas pró apoptóticas pode ser induzida por ligação do NFAT, tais como TNF- α , EGR e FasL [44] [45] [46] [47] [48]. Além disso, os fatores de transcrição NFAT também induzem genes anti apoptóticos, como o bcl-2 [49]. Foi demonstrado que NFAT é um componente crítico da via anti apoptótica de cardiomiócitos, regulando se a ativação da calcineurina leva à apoptose ou à sobrevivência dos cardiomiócitos, durante a estimulação de fenilefrina [50].

Resultados recentes mostram que o NFAT é importante, não só em células do sistema imune, mas também se liga e regula genes em diversos outros tipos celulares. Tem sido demonstrado que as proteínas NFAT estão envolvidas numa variedade de mecanismos celulares que regulam a diferenciação celular, a angiogénese e a progressão do ciclo celular [51] [52] [53].

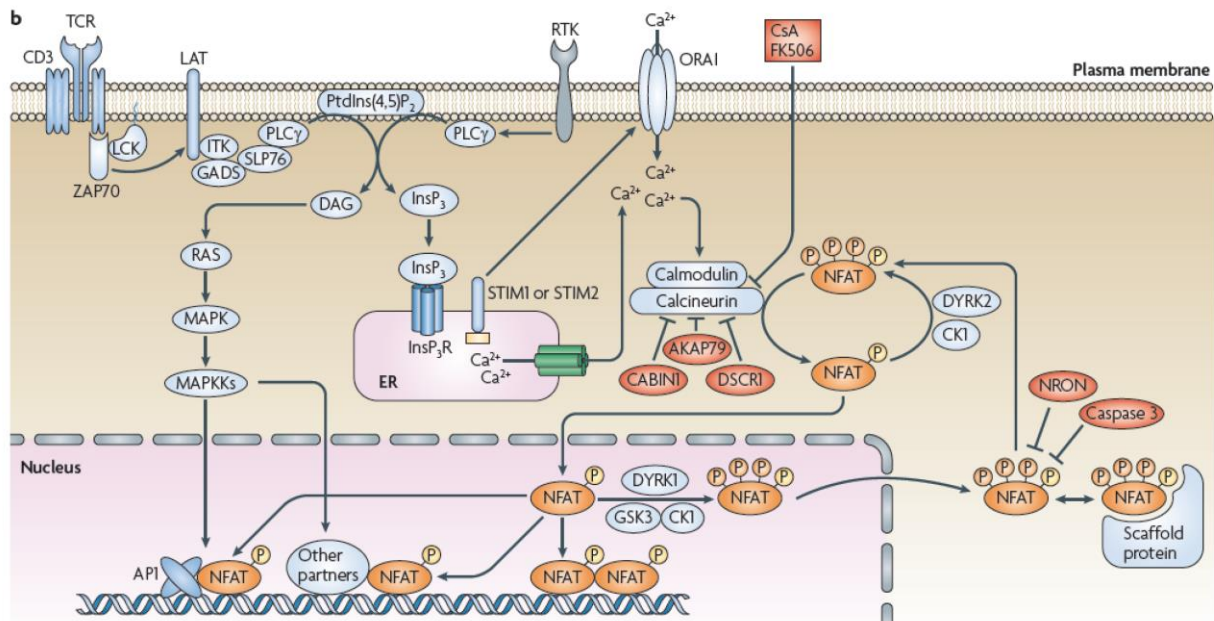


Figura 1: Ativação e regulação do NFAT. Imunoreceptores e receptores de tirosina cinase (RTKs) se ligam aos seus ligandos e ativam a fosfolipase Cγ (PLC γ) que, em retorno, hidrolisa o fosfatidil-4,5-bifosfato (PtdIns(4,5)P₂) em diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (InsP₃). O InsP₃ se liga ao seu receptor na membrana no retículo endoplasmático (ER) e induz o efluxo de cálcio (Ca²⁺). As moléculas STIM1 e STIM2, consequentemente, detectam a diminuição de Ca²⁺ no ER e comunicam com o canal de cálcio ORAI na membrana plasmática para que entre Ca²⁺ no citoplasma. O Ca²⁺ se liga à proteína sensora calmodulina que ativa a calcineurina. Esta desfosforila e ativa os fatores de transcrição NFAT, que se translocam para o núcleo, onde vão cooperar com múltiplos parceiros de transcrição, por exemplo a proteína ativadora AP-1, para regular a expressão genética. A ativação dos parceiros é controlada pela via da proteína cinase RAS (MAPK) e outras vias de sinalização. As proteínas NFAT são refosforiladas e inativadas por múltiplas NFAT cinases, tais como GSK3, CK1 e por inibidores específicos da fosforilação da tirosina: CABIN1, AKAP79 e DSCR1. A ciclosporina A (CsA) e o FK506 são inibidores farmacológicos da calcineurina. Diferentes proteínas *scaffold* interagem com o NFAT e estão envolvidas na regulação da sua atividade. O repressor não codificante do NFAT (NRON) e a caspase 3 são reguladores negativos da atividade do NFAT. GADS: proteína adaptadora de GRB2; ITK: cinases indutoras de IL-2; LAT: vinculador da ativação de células T; MAPKK: MAPK cinase; SLP76: leucócito que contém o domínio SH2 de 76 kDa; TCR: receptor de células T; ZAP70: cinase de 70 kDa. Figura adaptada de M. R. Müller & A. Rao, 2010 [54].

1.2 Regulação do Ciclo Celular

O ciclo celular é o fenômeno biológico que permite com que uma célula dê origem à duas células filhas com as mesmas características genéticas. Este fenômeno é caracterizado, principalmente, por dois eventos consecutivos, a duplicação do DNA e a segregação dos cromossomos. O ciclo celular pode ser morfológicamente dividido em dois estágios, a interfase, que consiste na fase G1, S e G2, e na mitose que inclui a profase, a metafase, a anafase e a telofase. A célula replica o seu DNA especificamente na fase S, a seguir ao primeiro intervalo, a fase G1, onde a célula se prepara para a síntese de DNA. Após a duplicação, ocorre um segundo intervalo, fase G2 e a célula se prepara para a mitose, fase M [55].

Inúmeras proteínas regulam o ciclo celular e direcionam a célula numa sequência específica de eventos que culminam na proliferação celular. A regulação do ciclo celular é realizada, essencialmente, por complexos formados por Ciclinas e CDKs (Cinases Dependentes de Ciclinas). CDKs são serina/treonina cinases ativadas em pontos específicos do ciclo celular e responsáveis pelo *check point* das transições das fases do ciclo [56].

1.2.1 Ciclinas

A ativação dos complexos Ciclinas/CDKs regula a progressão do ciclo celular uma vez que cada Ciclina promove a transição de uma fase específica do ciclo celular por ligação e ativação de CDKs específicas (Figura 2) [57].

As ciclinas do tipo D (ciclina D1, D2 e D3) se ligam a CDK4 ou a CDK6. Os complexos Ciclina D/CDK4-6 são essenciais para a entrada em G1 [58].

A Ciclina E se liga a CDK2 e regula a transição das fases G1 / S, promovendo a entrada na fase S e a sua progressão. O complexo Ciclina E/CDK2 controla a replicação do DNA, uma vez que fosforila a proteína Rb e libera E2F, que, por sua vez, controla a expressão de genes requeridos na fase S. A desregulação de Ciclina E tem sido associada com o desenvolvimento do tumor, sua agressividade e mau prognóstico em alguns cânceres humanos [59]. Análises de linfomas malignos revelaram que o aumento de expressão de ciclina E está correlacionado com a diminuição de expressão de p27 e que essas alterações estão associadas a um pior prognóstico dos pacientes [60].

As Ciclinas do tipo E humanas são altamente conservadas entre si. A Ciclina E1 foi descrita primeiro em 1991 e desde então tem sido demonstrado o seu importante papel na tumorigénese [61] [59] [62]. Em contrapartida a Ciclina E2 só foi descrita em

1998 [63] [64] [65]. Apesar de Ciclina E1 ser codificada por CCNE1 no cromossoma 19q12 e Ciclina E2 por CCNE2 no cromossoma 8q22.2, ou seja, por genes diferentes, as proteínas são funcionalmente redundantes [66]. As duas proteínas têm uma elevada percentagem de similaridade e importantes regiões funcionais estão conservadas em ambas as Ciclinas (Figura 3).

A ciclina A se liga a CDK2 e este complexo é necessário durante a fase S [67] [68]. No final da fase G2 e no início da fase M, a Ciclina A se liga a CDK1 para promover a entrada da célula na mitose. A fase mitótica é regulada também pelo complexo Ciclina B/CDK1 [69] [70].

Outros importantes reguladores do ciclo celular são os inibidores de CDKs. Estes podem se ligar a CDKs sozinhos ou aos complexos Ciclinas/CDKs e regular a sua atividade. Existem duas famílias de inibidores de CDK, a primeira classe é a família INK4, que inclui as proteínas p15 (INK4b), p16 (INK4a), p18 (INK4c) e p19 (INK4d). Essa família é responsável por inativar as CDKs que atuam na fase G1 (CDK4 e CDK6) e inibir essas CDKs por interferir na sua associação com a Ciclina D [71] [72] [73] [74] [75]. A segunda família de inibidores de CDKs é a Cip/Kip que inclui as proteínas p21 (Waf1, Cip1), p27 (Cip2), p57 (Kip2). Esses inibidores são bem caracterizados pelo seu papel como reguladores negativos das fases G1 e S [76] [77] [78].

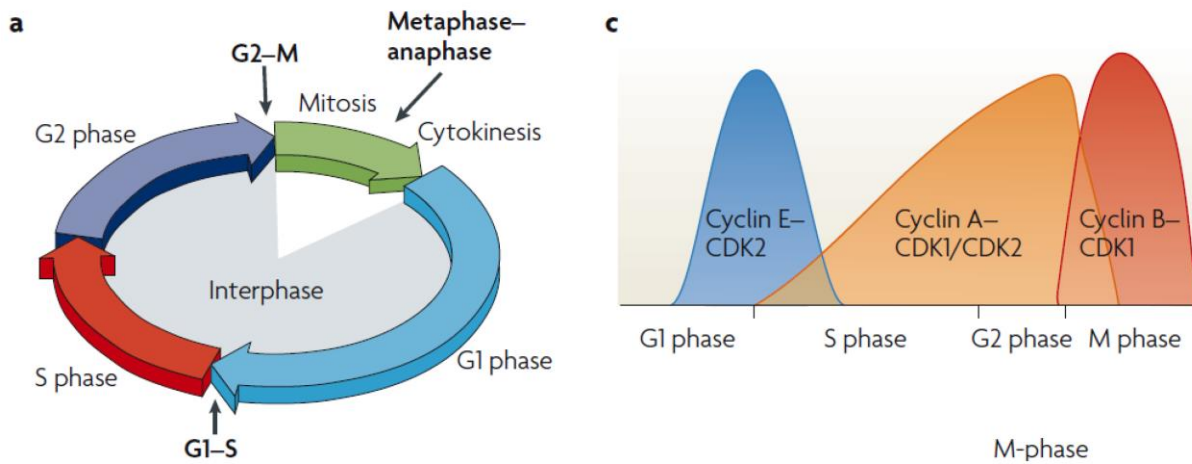


Figura 2: Regulação do ciclo celular por Ciclinas. As células passam por três principais transições durante o ciclo celular. O começo da fase S é marcado pela replicação do DNA, o início da mitose (fase M) é acompanhado pela ruptura da membrana nuclear e pela condensação dos cromossomos, enquanto que a segregação dos cromossomos marca a transição da metafase para a anafase. As cinases dependentes de Ciclina (CDKs) controlam a transição da fase G1 para a fase S e da fase G2 para a fase M através da fosforilação dos seus substratos. A transição da metafase para a anafase requer a ubiquitinação e a degradação via proteossoma das Ciclinas mitóticas do tipo B e de várias outras proteínas e é desencadeada pelo complexo APC/C. De acordo com o modelo clássico do controle do ciclo celular por Ciclinas, as Ciclinas do tipo D e CDK4 ou CDK6 regulam eventos no início da fase G1 (não mostrado), o complexo Ciclina E-CDK2 controla a fase S, os complexos Ciclina A-CDK1 e Ciclina A-CDK2 regulam o final da fase S e o complexo Ciclina B-CDK1 é responsável pela mitose. Figura adaptada de H. Hohegger *et al.*, 2008 [79].

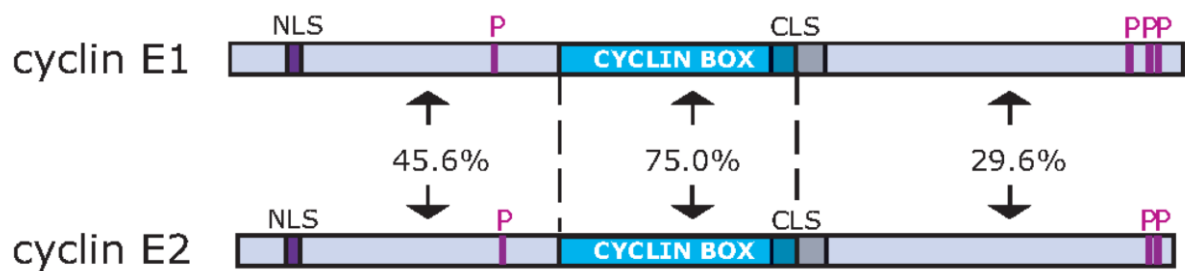


Figura 3: Similaridade das Ciclinas E1 e E2. As proteínas Ciclina E1 e E2 humanas foram alinhadas e a percentagem de similaridade foi calculada através do programa ALIGN. As sequências têm uma similaridade geral de 48.6%, com uma maior conservação na *cyclin box* (75%) e uma menor conservação na região N-terminal (45.6%) e C-terminal (29.6%). NLS: sequência de localização nuclear, CLS: sequência de localização centrossômica, P: região de fosforilação. Figura adaptada de C. E. Caldon & E. a Musgrove, 2010 [66].

1.2.2 Envolvimento do NFAT no controle do Ciclo Celular

A literatura tem sugerido que os fatores de transcrição NFAT possuem um papel importante na proliferação celular. O influxo de cálcio na célula e a consequente ativação da calcineurina estimulam a expressão de genes relacionados com a progressão do ciclo celular e promovem a transição da fase G1 para a fase S [80] [81].

De fato, as proteínas NFAT que são ativadas através de estímulos de cálcio e via ativação da calcineurina, regulam diretamente a expressão de algumas Ciclinas e CDKs. Por exemplo, foi demonstrado que NFAT1 se liga ao promotor de Ciclina A2 e reprime a sua expressão [53]. A literatura também mostra que NFAT1 possui um papel importante no controle do ciclo celular durante a ativação de linfócitos, uma vez que a hiperproliferação de linfócitos deficientes em NFAT1 está correlacionada com a superexpressão das Ciclinas A2, B1, E e F [82]. Além disso, o fator de transcrição NFAT1 inibe diretamente a expressão da cinase CDK4 em linfócitos T [83].

Foi mostrado, também, que a deficiência em NFAT1 causa hiperproliferação e aumento das taxas de ciclo celular, levando à expansão de células B foliculares [84] [85] [82]. Alguns estudos ainda sugerem que a indução da calcineurina fosfatase, e consequente ativação do NFAT, pode atuar na regulação do ciclo celular na transição da fase G0 para G1 e em estágios iniciais da fase G1 [86] [81].

Os fatores de transcrição NFAT também estão envolvidos na regulação da expressão de inibidores de CDKs. Por exemplo, foi demonstrado que a Ciclosporina A, um inibidor de calcineurina e de NFAT, inibe a expressão de p21 e p27, dois inibidores de CDKs [87]. Além disso, a Ciclosporina A e o FK506 inibem a expressão de Ciclina A e E em fibroblastos [81].

1.2.3 Envolvimento do NFAT na regulação da transformação celular

Como o fator de transcrição NFAT está envolvido em diversos processos celulares como diferenciação e proliferação celular, progressão do ciclo celular, angiogênese e apoptose, a sua atividade se revela essencial para a manutenção da fisiologia da célula. Assim, a desregulação da proteína NFAT pode desencadear a perda do controle de diversos mecanismos moleculares e ativar a transformação celular.

Foi demonstrado que a deficiência em NFAT1 leva à perda do controle do crescimento e da diferenciação de células do músculo [88]. Foi, também, mostrado que a

expressão de NFAT2 induz a transformação de fibroblastos, a desregulação da inibição por contato e a formação de colônia [51].

Os membros da família NFAT são regulados de forma semelhante entre si, contudo, possuem papéis distintos nas suas respostas celulares. Por exemplo, NFAT1 e NFAT2 têm efeitos opostos na tumorigênese. Enquanto NFAT1 parece reprimir a progressão do ciclo celular, NFAT2 aparenta ter função indutora da proliferação celular [89].

Além de controlar o ciclo celular, o fator de transcrição NFAT1 está envolvido na transformação celular uma vez que se liga a promotores de genes relacionados com a apoptose, como TNF- α e FasL e aumenta a sua expressão [27]. As células transformadas têm a capacidade de formar novos vasos a fim de providenciar nutrientes às células em proliferação. Foi demonstrado que o fator de transcrição NFAT3 e NFAT4 têm um papel na angiogênese, por exemplo em células do músculo [88] [80].

Em suma, os fatores de transcrição revelam a sua importância para a manutenção da fisiologia e no controle da transformação celular, não só em células do sistema imune, mas em diferentes tipos celulares.

1.2.4 Envolvimento do NFAT na regulação da transformação de linfócitos B

Tem sido descrito que os fatores de transcrição NFAT desempenham um papel no desenvolvimento de linfomas de células B. Foi demonstrado que NFAT2 está constitutivamente ativo em DLBCL (*Diffuse large B-cell lymphoma*) e interage com NF- κ B na ligação ao promotor de CD154 e ativa a sua transcrição [90]. CD154 é o ligando de CD40 e está descrito que possui expressão anormal em diversas doenças imunológicas, inclusive em linfomas de células B. Em contrapartida, a subregulação de NFAT e NF- κ B inibe a transcrição de CD154, que, por sua vez, inibe o crescimento do linfoma [90].

Os fatores de transcrição NFAT e NF- κ B também atuam juntos na regulação de BLyS (*B-lymphocyte stimulator*), um membro da família de TNF, também está constitutivamente expresso em linfomas Não – Hodgkin, inclusive DLBCL e MCL (*mantle cell lymphoma*) [91].

Os dados do nosso grupo demonstraram que NFAT1 controla a proliferação de linfócitos B primários murinos purificados, provenientes de ratinhos NFAT1^{-/-}, uma vez que a deficiência de NFAT1 induz a hiperproliferação dos linfócitos B quando são estimulados através de estímulos policlonais, tanto por estimulação com anti-IgM como por estimulação com PMA e Ionomicina. Além disso, os resultados do nosso grupo

mostraram também que NFAT1 inibe a expressão das Ciclinas E1 e E2 em linfócitos B primários tanto a nível de mRNA como a nível proteico, uma vez que os níveis de Ciclina E1 e E2 estão aumentados em células B deficientes em NFAT1 quando comparados com células selvagens depois de estimuladas com PMA e Ionomicina [92].

Em suma, os dados do grupo indicam que o fator de transcrição NFAT1 desempenha um papel repressor na progressão do ciclo celular e na expressão da Ciclina E em linfócitos B.

2. Objetivos

Uma vez que a desregulação da proliferação de células do sistema imune desempenha um papel importante no desenvolvimento de malignidades linfocitárias, o objetivo central deste trabalho é avaliar como a proteína NFAT1 regula a expressão das Ciclinas E1 e E2 em células B e, assim, desvendar de que modo NFAT1 controla a ativação e transformação de linfócitos B.

2.1 Objetivos específicos

1. Determinar sítios putativos de ligação para o fator de transcrição NFAT no promotor proximal das ciclinas E1 e E2 humanas;
2. Desenhar oligonucleotídeos e avaliar a sua eficiência por PCR em tempo real para as regiões promotoras com sítios putativos para NFAT;
3. Estabelecer o protocolo de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) em células Raji;
4. Avaliar a ligação do fator de transcrição NFAT1 ao promotor das ciclinas E1 e E2 humanas em células Raji.

3. Materiais e Métodos

3.1 Células, Meios e Reagentes

Foi utilizado neste estudo a linha celular Raji, um linfoma de Burkitt humano de células B (ATCC® CCL86). As células Raji foram cultivadas em meio de cultura RPMI (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de Piruvato de Sódio, 55 nM de 2-Mercaptoetanol, 100 U/mL de Penicilina e 100 µg/mL de Estreptomicina (Gibco). As células Raji foram cultivadas e incubadas em 5% de CO₂ a 37°C para a realização dos experimentos.

Os seguintes reagentes utilizados foram obtidos da Sigma: Bicarbonato de Sódio, Butirato de Sódio, Cloreto de Lítio, Desoxicolato de Sódio, EDTA, EGTA, Fluoreto de Sódio, Formaldeído, Glicerofosfato, Glicina, HEPES, Ortovanadato de Sódio, PBS, Pepstatina A e Triton X-100. Foram, também, usados os reagentes: Cloreto de Sódio (Merck), DNA de esperma de salmão (Invitrogen), NP-40 (Calbiochem), SDS (Invitrogen), Tris (Merck) e os inibidores de protease *Complete Tablets, Mini EASYpack* (Roche, 04 693 124 001).

Os anticorpos anti-67.1 e anti-T2B1 foram gentilmente cedidos pela Dr^a Anjana Rao (La Jolla Institute for Allergy and Immunology, Califórnia, Estados Unidos) e o anticorpo anti-histona H4 acetilada foi obtido da empresa Upstate Biotechnology (06-866).

3.2 Ensaio de Imunoprecipitação de Cromatina (ChIP)

Células Raji (20 x 10⁶ células) foram estimuladas *in vitro* com PMA (10 nM) e Ionomicina (1 µM) por 20 minutos a 37°C em 5% de CO₂. Seguidamente as células foram fixadas com uma solução de 1.1% de Formaldeído (10 mM NaCl, 0.1 mM EDTA pH 8.0, 0.05 mM EGTA pH 8.0, 5 mM HEPES pH 7.5 e 1.1% Formaldeído) por 20 minutos a 4°C. Para neutralizar a reação foi adicionada 125 mM de Glicina e a amostra foi incubada por 7 minutos a 4°C. As células foram centrifugadas a 481 g por 5 minutos a 4°C, lavadas duas vezes com PBS a 4°C, e lisadas com um tampão de lise (50 mM Tris pH 8.0, 5 mM EDTA pH 8.0, 1% SDS, 10 mM Butirato de Sódio, 1 mM NaF, 10 mM Glicerofosfato, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM Pepstatina A e inibidores de protease de acordo com as especificações do fabricante).

Posteriormente a cromatina foi sonicada a 4°C, por 40 vezes durante 30 segundos, com intervalos de 30 segundos entre cada pulso de sonicação, na intensidade

máxima (Diagenode, Bioruptor® 300). Após a sonicação a cromatina foi centrifugada a 16.900 g por 10 minutos a 4°C e o tamanho dos fragmentos de cromatina foi verificado por eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE 1x. Foi utilizado o padrão de peso molecular de 100 pares de base (*1Kb Plus DNA Ladder*, 10787-018). O próximo passo foi preparar 0.05 g/mL de contas de proteína A sefarose (CL-4B, GE Healthcare) em H₂O. A solução foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente, com agitação branda e centrifugada a 751 g por 5 minutos a temperatura ambiente. O *pellet* foi lavado gentilmente com H₂O milli Q, centrifugado e lavado duas vezes com tampão de lise e ressuspendido em 1 volume de tampão de lise. Para bloquear as contas, estas foram incubadas com DNA de esperma de salmão (100 µg/mL) por 1 hora a 4°C, com agitação branda. Depois da incubação as contas foram centrifugadas a 2.700 g por 2 minutos a 4°C e ressuspendidas em 1 volume tampão de lise.

Seguidamente a cromatina foi diluída em tampão de diluição (20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 8.0, 1% Triton X-100, 10 mM Butirato de Sódio, 1 mM NaF, 10 mM Glicerofosfato, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM Pepstatina A e inibidores de protease de acordo com as especificações do fabricante) e incubada com as contas bloqueadas por 2 horas a 4°C, com agitação branda. Após a incubação a solução foi centrifugada a 1.100 g por 5 minutos a 4°C, para remover as contas. O sobrenadante foi recuperado e 5% desse sobrenadante foi separado para servir como referência (INPUT). O restante foi aliquoteado em três frações de volumes idênticos e a cada alíquota, foi adicionado: 1) anticorpos anti-NFAT1 (15 µg de anti-67.1 e 7.5 µg de anti-T2B1); 2) anticorpo anti-histona H4 acetilada (10 µg de anti-H4ac); e 3) não foi adicionado nenhum anticorpo no controle negativo. As alíquotas foram incubadas por 16 horas a 4°C, com agitação branda.

No dia seguinte, para se livrar dos complexos imunes inespecíficos, as amostras foram centrifugadas a 16.900 g por 2 minutos a 4°C e o sobrenadante foi recuperado. As contas preparadas no dia anterior foram lavadas com tampão de lise (50 mM Tris pH 8.0, 5 mM EDTA pH 8.0, 1% SDS) e adicionadas às amostras juntamente com DNA de esperma de salmão (15 µg/mL). As amostras foram incubadas por 3 horas a 4°C, com agitação branda. Após a incubação as amostras foram centrifugadas a 2.700 g por 5 minutos a 4°C e o *pellet* foi lavado sequencialmente e incubado por 5 minutos a 4°C com as soluções RIPA (50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% Desoxicolato de Sódio, 1% NP-40, 1 mM EDTA, 1 mM Pepstatina A e inibidores de protease de acordo com as especificações do fabricante), *High Salt* (50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% Desoxicolato de Sódio, 1% NP-40, 1 mM EDTA, 1 mM Pepstatina A e inibidores de protease de acordo com as especificações do fabricante), Cloreto de Lítio (50 mM Tris pH 8.0, 250 mM LiCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.5% Desoxicolato de Sódio,

1 mM Pepstatina A e inibidores de protease de acordo com as especificações do fabricante) e duas vezes com TE (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 mM Pepstatina A e inibidores de protease de acordo com as especificações do fabricante). Seguidamente as amostras foram novamente centrifugadas a 2.700 g por 5 minutos a 4°C e o *pellet* foi ressuspenso em tampão de eluição (0,1 M NaHCO₃, 1% SDS). Foi adicionado em todas as amostras, inclusive no INPUT, 5 mg/mL de RNase A (Sigma) e as amostras foram incubadas por 30 minutos a 37°C. Posteriormente foi adicionado 1% de SDS e 400 mg de Proteinase K (Sigma) às amostras. As amostras foram incubadas por 4 horas a 50°C e, em seguida, por 16 horas a 65°C.

3.3 Extração de DNA

O DNA foi extraído através do kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen, 28704), segundo as instruções do fabricante. O DNA recuperado foi quantificado com auxílio de um espectrofotômetro (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific) e a cromatina sonicada (INPUT) foi submetida a uma eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE.

3.4 Análise Bioinformática

As sequências genômicas dos promotores de Ciclina E1 e E2 humanos foram obtidas do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Assembly GRCh38, Annotation Release ID: 107), em 21 de Janeiro de 2016. Os números de acesso foram os seguintes: NC_000019.10 (CCNE1) and NC_000008.11 (CCNE2). Os sítios putativos de ligação dos fatores de transcrição da família NFAT nos promotores proximais de Ciclina E1 e E2 foram analisados utilizando os programas *TRANSFAC Professional* e *Match 1.0* (BIOBASE Biological Databases).

Os pares de *primers* foram desenhados com o auxílio do programa *PrimerQuest* (IDT) e a eficiência dos pares de *primers* foi verificada através do programa *Electronic PCR* (NCBI, National Institutes of Health). Os *primers* utilizados foram os seguintes: hCCNE1 Par de *Primer* 1: 5' GCC TCA ACT GGA AGG CTT TA 3' e 5' GTG CAT TGG GTC GTT CAT TC 3' (produto de PCR de 167 pb; sítios de ligação para NFAT -829, -765, e -752 pb); hCCNE1 Par de *Primer* 2: 5' GCA TGG AAG GAA CTC ACA GA 3' e 5' GCC TAG AAC CAA GGC TTC A 3' (produto de PCR de 140 pb; sítios de ligação para NFAT -752 e -677 pb); hCCNE1 Par de *Primer* 3: 5' ACT CAG GGC CCG GAA CTC 3' e 5' GGC

GCG GGT GGA ATG TAA A 3' (produto de PCR de 175 pb; sítio de ligação para NFAT - 507 pb); hCCNE1 Par de *Primer 4*: 5' CGC AGG CCC TGT ACA TTG 3' e 5' GGC TCA GAG CGG GAC ATT TA 3' (produto de PCR de 237 pb; sítio de ligação para NFAT -48 pb); hCCNE2 Par de *Primer 1*: 5' GTG GAG AAG AGA GGA AGC AA 3' e 5' AGG TAT GTA TCA ACC CTG CTT T 3' (produto de PCR de 184 pb; sítios de ligação para NFAT - 810, -723, e -695 pb); hCCNE2 Par de *Primer 2*: 5' CGG AAA GCA GGG TTG ATA CA 3' e 5' GGA GTG GCT GCA GAA TGT AA 3' (produto de PCR de 174 pb; sítios de ligação para NFAT -695 e -658 pb); hCCNE2 Par de *Primer 3*: 5' CTC CCA TTG GCC AGC TCT TC 3' e 5' ATA GGG TGG CTG GGA AGT GA 3' (produto de PCR de 153 pb; sítio de ligação para NFAT -426 pb); hCCNE2 Par de *Primer 4*: 5' TAT GGT CGC CCG AGT CGT 3' e 5' GGC GGT AGG GAA ACT CTC A 3' (produto de PCR de 177 pb; sítio de ligação para NFAT -187 pb).

3.5 PCR em Tempo Real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas com 1 µL de controle negativo ou DNA imunoprecipitado e o reagente *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), de acordo com as especificações do fabricante. As condições de PCR foram as seguintes: 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto e por fim 95 °C por 1 minuto. A curva de dissociação foi obtida através de uma reação de aquecimento das amostras entre 50°C a 90°C, seguida de 60°C por 1 minuto (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems). Os produtos do PCR de tempo real foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 2% em TAE para verificação do número e tamanho dos fragmentos amplificados. Foi utilizado o padrão de peso molecular de 50 pares de base (10416014, Invitrogen). A imunoprecipitação de NFAT1 e de H4ac foi normalizada pelo controle negativo (Sem anticorpo) e o resultado foi expresso como enriquecimento da triplicata do PCR em relação à amostra sem anticorpo (Enriquecimento relativo).

4. Resultados

Para avaliar se o fator de transcrição NFAT1 era capaz de se ligar aos promotores das Ciclinas E1 e E2 humanas em linfócitos B, foram feitas, primeiramente, análises bioinformáticas na região proximal desses promotores (850 pares de base iniciais). Foram determinados seis sítios putativos de ligação dos fatores de transcrição NFAT a cada um dos promotores, baseados na sequência consenso de ligação ao DNA 5'-(A/T)GGAAA(A/N)(A/T/C)N -3', sendo N a representação de qualquer nucleotídeo (Figuras 1 e 2). Os sítios consensos para ligação de NFAT localizam-se nas posições -829, -765, -752, -677, -507 e -48 pares de bases do início de transcrição do promotor de Ciclina E1 humana (hCCNE1, Figura 1). No promotor de Ciclina E2, os sítios consensos para ligação de NFAT localizam-se nas posições -810, -723, -695, -658, -426 e -187 pares de base (hCCNE2, Figura 2).

Seguidamente, para avaliar a capacidade de ligação do fator de transcrição NFAT1 nos promotores humanos de Ciclina E através da metodologia de Imunoprecipitação de Cromatina (ChIP), foram desenhados quatro pares de *primers*, que englobam os sítios putativos de ligação do NFAT nos promotores de Ciclina E1 (hCCNE1, Figura 3A) e Ciclina E2 (hCCNE2, Figura 3B), segundo descrito nos materiais e métodos.

-850

AAGTGAGAGATGGGGTGCAAG**GGAAT**CCCAGAGTCAGAAAGGTCTTCAGAGAGCCAGGAA
GGGCTTGCGGGGGAGGGGCGCATAT**GGAAG**GGGCGCAT**GGAAG**GAACTCACAGATTCCCTT
GAATGAATGAATGAACGACCCAATGCACTGACGGATGAATGGACAGGCGGCCA**GGAAT**AG
CAGCCGGCCCCCAGGGAGCCCCAGACCCCGCGGCCTGAAGCCTTGGTTCTAGGCCAAGGC
ACAGGCGCGGTGACCTTGGGGATGTCCCCGCCAGGACTCAGGGCCCCGGAACCTCGGCGTC
TCGGGGGCGGGGAGGGCGTGCCTGGCGGGACAGCGCGCGCGGA**GGAAC**GGCGGGCGGTGC
TCCTCGGGTAGGCCCCCACACATCCCCTTGGCTCAGCCCTGCCGGGGCCCGAACCCGCG
CCGCCCCGCGTGTTTACATTCCACCCGCGCCAGCCACGCGGCTTTTTGCCGCTCCAGCGC
CGCTCGGCCCCGCCCCGCGCCCCGCGGCCCGCCCCCTCGCCGCCGCGCGCCAGACTTCTC
CCGCGTCCCGCCCCGCCCCGCCCCGCGTCCCGCGCCCCGCGCCCCGCGCCCCGGCCCTC
GGCGCGCAGGCCCTGTCACTTGGCCCCGCCCTGTCCGCCGGCCCCGCCCCCTGATTCCCCG
TCCCTGCGCCTCGCGGGCCGGCGCCGTGGAGGGGCGGGTCCGGGGGCGGGGCGAGGGACG
GGGCGGGACGGGCTCTGGGTCCCGCGCGGCCGCTGAGGGGCTGGGAGCCGCGGCGGGGCG
GTGCGAGGGCGGGCCGGGGCCG**GTTCC**GCGCGCAGGGATTTTAAATGTCCCGCTCTGAGC
CGGGCGCAGG**AGCAGCCGGCGCGGCCGBCAGCGCGGTGTAGGGGGCAGGCGCGGATCCCCG**

+1

Figura 1: Sequência de DNA do promotor proximal da Ciclina E1 humana até 850 pares de base do início de transcrição do gene. A vermelho estão indicados os sítios putativos de ligação do NFAT (sítio consenso: 5'- GGAAA -3'). A azul está indicado o início do gene humano de Ciclina E1.

-850

GAAGAGAGGAAGCAAGGGAGGGCGCGGCGTGGCGCGAGCG**TTTCC**TGCGCGGGGACTGCG
GGGTGGCAGCTGGAGGCCACTGCAGGGGCAGAGCGGCGGGTTGGGGGAGCGACCGACCCA
TGGGGAG**GGAAA**CCCGGTAGGGGGAGCAGGGAGCC**GGAAA**GCAGGGTTGATACATACCTG
GGTGGGCGGGCT**GGAAA**TGCCTTCCCTGGGCGCGCCGCGCAAGGCCGGCGGAGCGGGCTC
CGGGTGGTCGCGGACCGGGACTGGGGAGAGCAGAGCCGCACTTGGCCAGGCGCGTGGCTG
AGTGGTGTTTACATTCTGCAGCCACTCCACGTTGTGCTGCCGCCCGTGCCTCCCATTTGGC
CAGCTCTTCAGCCAACGCTTTGCTCCTCCCCGAGGGGGCGGGCCCTCGGGTCCCCGCGTCG
CTCA**GGAAA**GACCTGGGTTCCTGAGGCCTTGGCGGGACAGCTAGGGCGCGCCCCTGGAC
GGTCACTTCCCAGCCACCCTATGGTTCGCCCCGAGTCGTGTCCCCCTGTTATGCGCCCGGGC
TGAGCCGCAGGCTGACACCCCCGAAATCCAGGAGTTGCAGTGGGAGGAAGCAAAAGCAAA
CTGGCGGGAGATGCGCGAGCCAGGCGGGCGGGGAGAACAGCCGCGGAGAAGGAGCCCCTGA
GAG**TTTCC**CTACCGCCGCCGGCCGCGCCGTGGAGCGCGGTGGACGCGGGCAGAAGGCCCG
GTAGAGTGGACCCACGGCCGCTCCGGGTGGCGGGCGCGCACTGAGAGCAGGGCGCGGCG
CGCGGGCACGCGGGCGGACGGGCGGGAGAGGGGAGCGCGCTGTCCGGAGGTGTCAGTCTG
AGGCGCATGC**GTGCGGGGCGGGACCGGCCCGGCCTATATATTGGGTTGGCGCCGGCGCCA**
+1

Figura 2: Sequência de DNA do promotor proximal da Ciclina E2 humana até 850 pares de base do início de transcrição do gene. A vermelho estão indicados os sítios putativos de ligação do NFAT (sítio consenso: 5'- GGAAA -3'). A azul está indicado o início do gene humano de Ciclina E2.

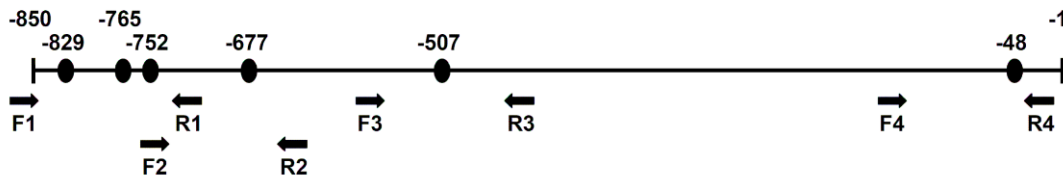
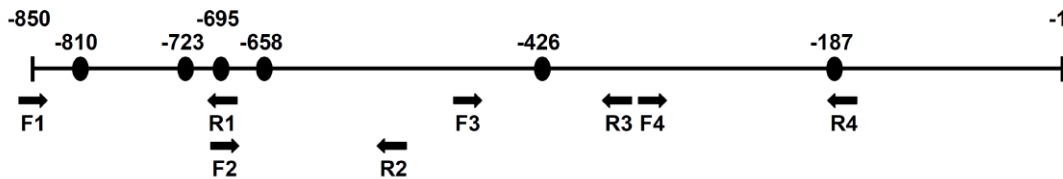
A**Promotor de hCCNE1****B****Promotor de hCCNE2**

Figura 3: Esquema dos promotores de Ciclina E1 e E2 humanas (hCCNE1 e hCCNE2) e dos pares de *primers* desenhados. **(A)** Promotor de Ciclina E1 humana (hCCNE1): par de *primer* 1 (engloba as posições -829, -765, -752 pares de base), par de *primer* 2 (engloba as posições -752 e -677 pares de base), par de *primer* 3 (engloba a posição -507 pares de base) e par de *primer* 4 (engloba a posição -48 pares de base). **(B)** Promotor de Ciclina E2 humana (hCCNE2): par de *primer* 1 (engloba as posições -810, -723, -695 pares de base), par de *primer* 2 (engloba as posições -695 e -658 pares de base), par de *primer* 3 (engloba a posição -426 pares de base) e par de *primer* 4 (engloba a posição -187 pb). As esferas pretas representam os possíveis sítios de ligação de NFAT e as setas indicam os *primers*. F, indica os *primers* Forward. R, indica os *primers* Reverse.

De seguida a eficiência e a qualidade das reações de PCR em tempo real foi estabelecida para as regiões anteriormente determinadas dos promotores humanos de CCNE1 e CCNE2. As reações de PCR em tempo real foram realizadas com DNA genómico humano em uma diluição seriada de dez vezes (20, 2, 0.2 e 0.02 nanogramas) e os quatro pares de *primers* para cada um dos promotores de Ciclina E1 e E2 humanas (Figura 3). As reações de PCR em tempo real geraram curvas de amplificação (Figura 4) e curvas de dissociação dos produtos de PCR (Figura 5) para cada um dos pares de *primers*. As figuras 4 e 5 são representativas de um par de *primer* de cada um dos promotores de Ciclina E1 e E2. As figuras 4A e 5A representam o par de *primer* 1 do promotor de Ciclina E1 e as figuras 4B e 5B representam o par de *primer* 1 do promotor de Ciclina E2.

As curvas de amplificação indicaram que a quantidade dos produtos de PCR gerados é proporcional à quantidade de DNA genómico humano utilizado em cada reação (Figura 4, curvas azuis e verdes). Reações de PCR em tempo real realizadas na presença de 20 ng de DNA apresentaram um Ct de aproximadamente 24 ciclos, enquanto reações de PCR em tempo real realizadas na presença de 0.02 ng de DNA apresentaram um Ct de aproximadamente 34 ciclos (Figuras 4A e 4B). As curvas amarelas representam o controle negativo da reação de PCR em tempo real (ausência de DNA genómico). Os resultados indicam que não houve amplificação do promotor de hCCNE1, indicando que as reações de PCR em tempo real não estavam contaminadas com DNA inespecífico (Figura 4A). Aparentemente, houve amplificação do controle negativo do promotor de hCCNE2 (Figura 4B), no entanto não foi detectado nenhum produto de PCR através de eletroforese em gel de agarose (dado não mostrado). Esses resultados sugerem que a fluorescência detectada se deve a algum problema intrínseco do par de *primer*.

As curvas de dissociação representam a variação na intensidade de fluorescência dos produtos gerados nas reações de PCR em tempo real. No início da curva de dissociação, o produto de PCR se apresenta em cadeia dupla e, por isso, a fluorescência é máxima. Ao longo do aumento da temperatura, ocorre a desnaturação do produto de PCR, a liberação do agente intercalante fluorescente e a diminuição do sinal de fluorescência. A curva de dissociação representativa do produto de PCR gerado pelo par de *primer* 1 do promotor humano de Ciclina E1 apresentou um pico único, sugerindo que o produto de PCR originado era específico (Figura 5A, curvas azuis). Da mesma forma, o produto de PCR gerado pelo par de *primer* 1 do promotor de Ciclina E2 apresentou apenas um pico, apesar deste último ter apresentado uma curva de dissociação com uma forma incomum (Figura 5B, curvas azuis). As curvas amarelas representam o controle negativo (ausência de DNA genómico), que não originou sinal de fluorescência nem para

o promotor de hCCNE1 nem para o promotor de hCCNE2, indicando que as reações de PCR em tempo real não estavam contaminadas com DNA inespecífico. Finalmente, para verificar a eficiência dos pares de *primers*, foi realizada uma regressão linear entre a quantidade de DNA em nanogramas utilizada em cada reação de PCR em tempo real e o número de ciclos de amplificação (Ct) (Figura 6). Ambas regressões apresentaram um coeficiente de correlação de $R^2 = 0.99$ que indica que a relação entre as duas variáveis é linear e inversamente proporcional (Figura 6). A figura 6 é representativa de um par de *primer* de cada um dos promotores de Ciclina E1 (Figura 6A) e Ciclina E2 (Figura 6B).

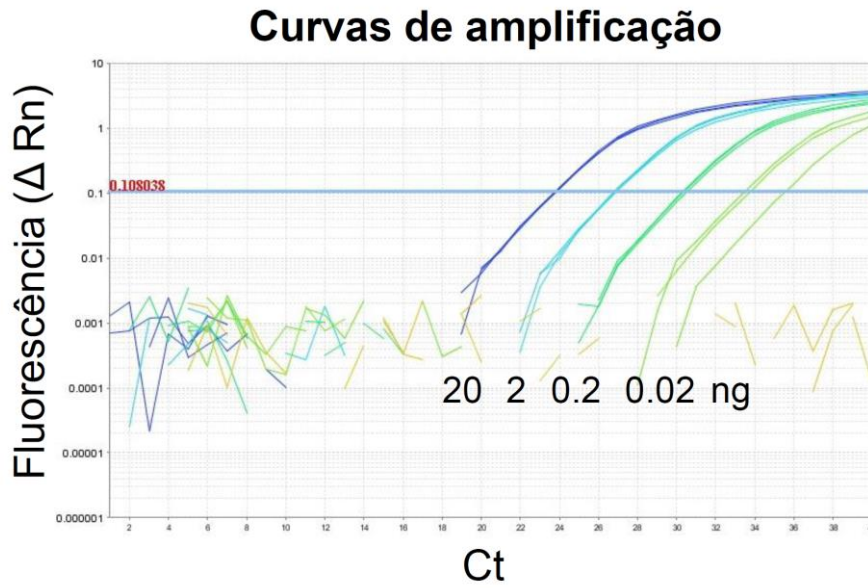
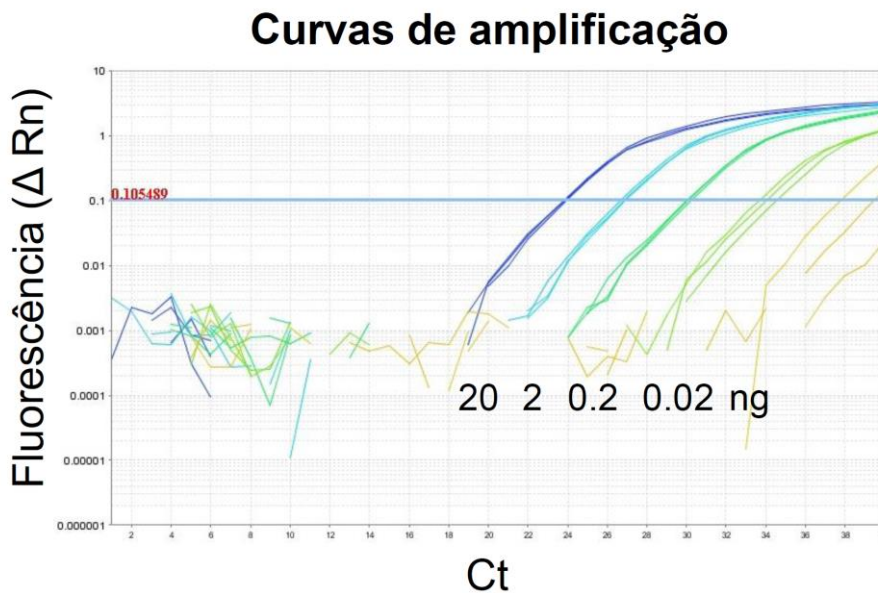
A**B**

Figura 4: Curvas de amplificação dos produtos de PCR em tempo real a partir de diluições seriadas de DNA genômico humano. Os gráficos apresentam a relação entre a fluorescência emitida durante a reação e o número de ciclos de amplificação (Ct). A linha horizontal determina o nível de detecção de fluorescência gerada em fase exponencial (*Threshold*). As diferentes quantidades de DNA utilizadas em cada reação estão representadas abaixo de cada curva e expressas em nanogramas (ng) (curvas azuis e verdes). As curvas amarelas representam o controle negativo (ausência de DNA genômico). **(A)** Promotor de Ciclina E1: par de *primer* 1. **(B)** Promotor de Ciclina E2: par de *primer* 1.

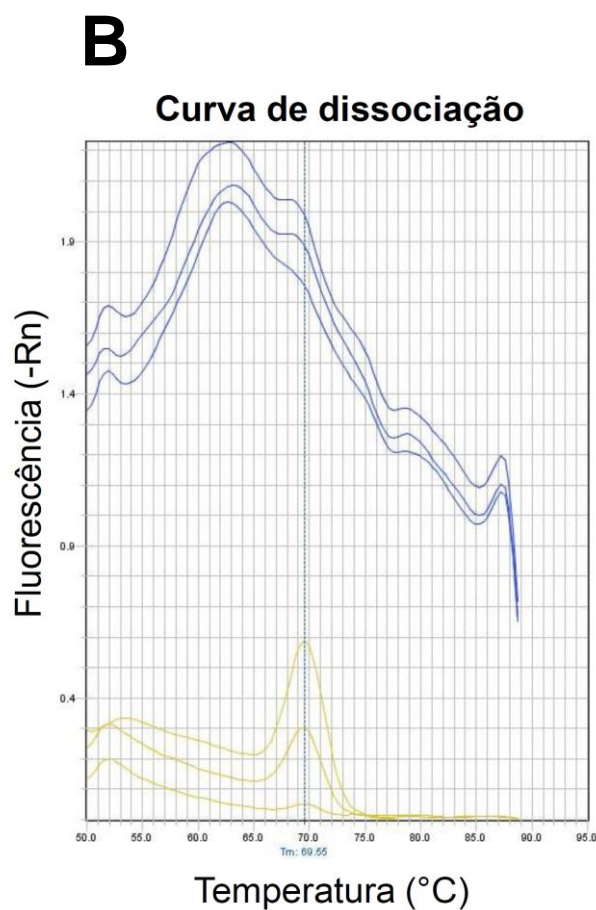
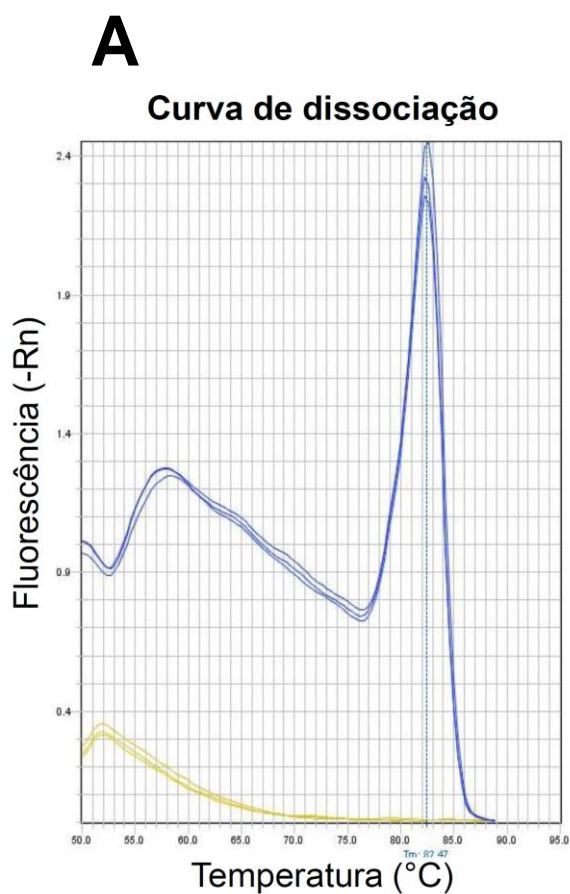


Figura 5: Curvas de dissociação dos produtos de PCR em tempo real. Os gráficos apresentam a relação entre a fluorescência emitida e a temperatura de desnaturação dos produtos de PCR. As curvas azuis representam a reação realizada com 20 ng de DNA e as curvas amarelas representam o controle negativo. A linha vertical indica o ponto onde 50% do produto de PCR se encontra desnaturado. **(A)** Promotor de Ciclina E1: par de *primer* 1. **(B)** Promotor de Ciclina E2: par de *primer* 1.

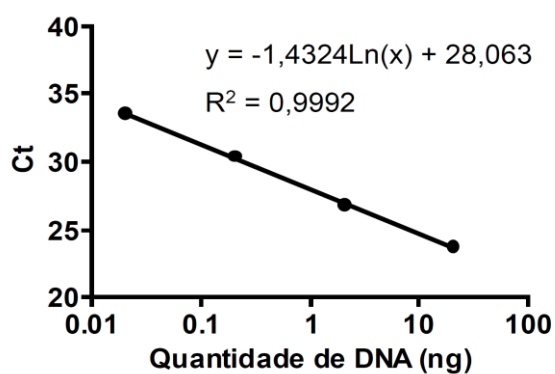
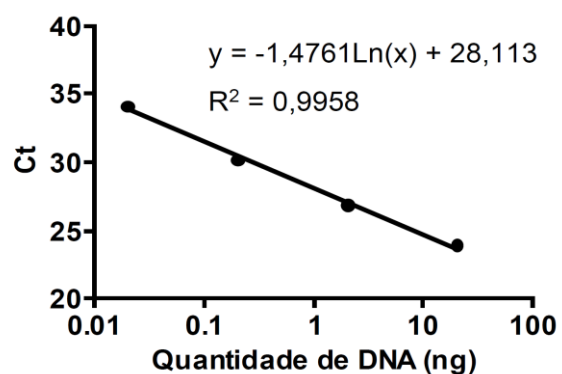
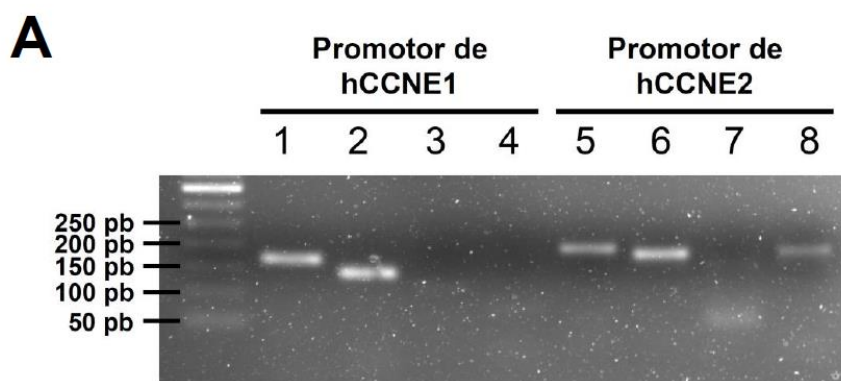
A**Promotor de hCCNE1 - Par de Primer 1****B****Promotor de hCCNE2 - Par de Primer 1**

Figura 6: Relação entre o número de ciclos de amplificação (Ct) e a quantidade de DNA genômico humano utilizado em nanogramas (ng) nas reações de PCR em tempo real. **(A)** Promotor de Ciclina E1: par de *primer 1*. **(B)** Promotor de Ciclina E2: par de *primer 1*.

A fim de se confirmar a especificidade dos pares de *primers*, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TAE 1x dos produtos do PCR em tempo real das regiões dos promotores de hCCNE1 e hCCNE2 abrangidas pelos diferentes pares de *primers*. Foi observado que somente os pares de *primer* 1 e 2 originaram os produtos de amplificação de tamanhos esperados para o promotor de hCCNE1 (167 pb e 140 pb, respectivamente) (Figura 7, Linhas 1 e 2, respectivamente). As reações de PCR dos pares de *primers* 3 e 4 para o promotor de hCCNE1 não apresentaram nenhum produto de PCR visível em gel de agarose (Figura 7, Linhas 3 e 4, respectivamente). Em relação ao promotor de hCCNE2, os pares de *primer* 1 e 2 originaram os produtos de amplificação de tamanhos esperados (184 pb e 174 pb, respectivamente) (Figura 7, Linhas 5 e 6, respectivamente). Foi observada uma banda inespecífica para o par de *primer* 3 (Figura 7, Linha 7), sugestiva da formação de dímeros de *primers*. O par de *primer* 4 originou um produto único e de tamanho esperado (177 pb), mas com menor eficiência (Figura 7, Linha 8). Dado isso, os experimentos seguintes foram realizados apenas com os pares de *primer* 1 e 2 de hCCNE1 e hCCNE2.



B

	Par de <i>primer</i>	Tamanho do produto (pb)
Promotor de hCCNE1	1	167
	2	140
	3	175
	4	237
Promotor de hCCNE2	1	184
	2	174
	3	153
	4	177

Figura 7: Produtos de PCR em tempo real de regiões específicas dos promotores de hCCNE1 e hCCNE2. **(A)** Eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TAE 1x. Padrão de peso molecular de 50 pares de base. (1-4) Promotor de hCCNE1, pares de *primers* 1-4, respetivamente. (5-6) Promotor de hCCNE2, pares de *primers* 1-4, respetivamente. **(B)** Tabela indicando os tamanhos esperados dos produtos de PCR em tempo real para cada par de *primer* de hCCNE1 e hCCNE2.

Uma vez avaliada a eficiência dos pares de *primers* em reações de PCR em tempo real foi realizado o ensaio de imunoprecipitação de cromatina (ChIP). As células Raji foram cultivadas, estimuladas com PMA e Ionomicina e fixadas com formaldeído. De seguida foi realizada uma das principais etapas da metodologia de ChIP, a sonicação, ou seja, a fragmentação, da cromatina. Para o sucesso da metodologia de ChIP, é fundamental que a cromatina seja fragmentada em tamanhos de 300 a 500 pares de base para que possa haver imunoprecipitação especificamente da região esperada. A fim de se chegar ao tamanho desejado foram utilizadas diferentes condições de sonicação. Foram testados diferentes sonicadores, o número e a intensidade dos pulsos de sonicação, o intervalo entre os pulsos e o número de células Raji. As primeiras condições foram testadas no sonicador *Ultrasonic Processor* (Cole-Parmer, GEX 130PB) com uma intensidade de 50% e 20×10^6 células. Foi observada uma crescente melhoria das condições de sonicação. Inicialmente foram testados 5 pulsos de sonicação de 15 segundos cada com intervalos de 90 segundos entre cada pulso. Nessa condição, foi observada uma grande quantidade de DNA de elevado peso molecular, revelando que uma grande parte do DNA genómico ainda não estava a ser fragmentada no tamanho esperado (Figura 8A, linha 1). Essa quantidade de DNA pouco fragmentado diminuiu quando se aumentou o número de pulsos de sonicação para 10 (Figura 8A, linha 2). Quando foram realizados 15 pulsos, essa quantidade de DNA de alto peso molecular diminuiu ainda mais e foi possível observar uma maior quantidade de DNA com peso molecular inferior a 500 pares de base (Figura 8A, linha 3). De seguida, foi testado ainda outro sonicador, Diagenode (Bioruptor® 300) na intensidade máxima. A sonicação da cromatina observada foi mais eficaz neste sonicador uma vez que quase não se observou DNA com peso molecular acima de 650 pb (Figura 8B). Nesse sonicador a primeira condição testada foi com 20×10^6 células, 30 pulsos de sonicação de 30 segundos cada com 30 segundos de intervalo entre os pulsos (Figura 8B, linha 4). Quando foram mantidos o número e o tempo dos pulsos de sonicação, mas aumentado o número de células para 40×10^6 , houve uma grande quantidade de DNA com peso molecular inferior a 300 pb (Figura 8B, linha 5). Esses tamanhos de cromatina não são adequados para a reação de ChIP, uma vez que os fragmentos devem conter a integridade da região do DNA de interesse. A sonicação estabelecida para seguir com o experimento foi de 40 pulsos de sonicação de 30 segundos cada com 30 segundos de intervalo entre cada pulso, utilizando 20×10^6 células (Figura 8B, linha 6), uma vez que originou fragmentos de DNA com o tamanho esperado de 300-650 pb.

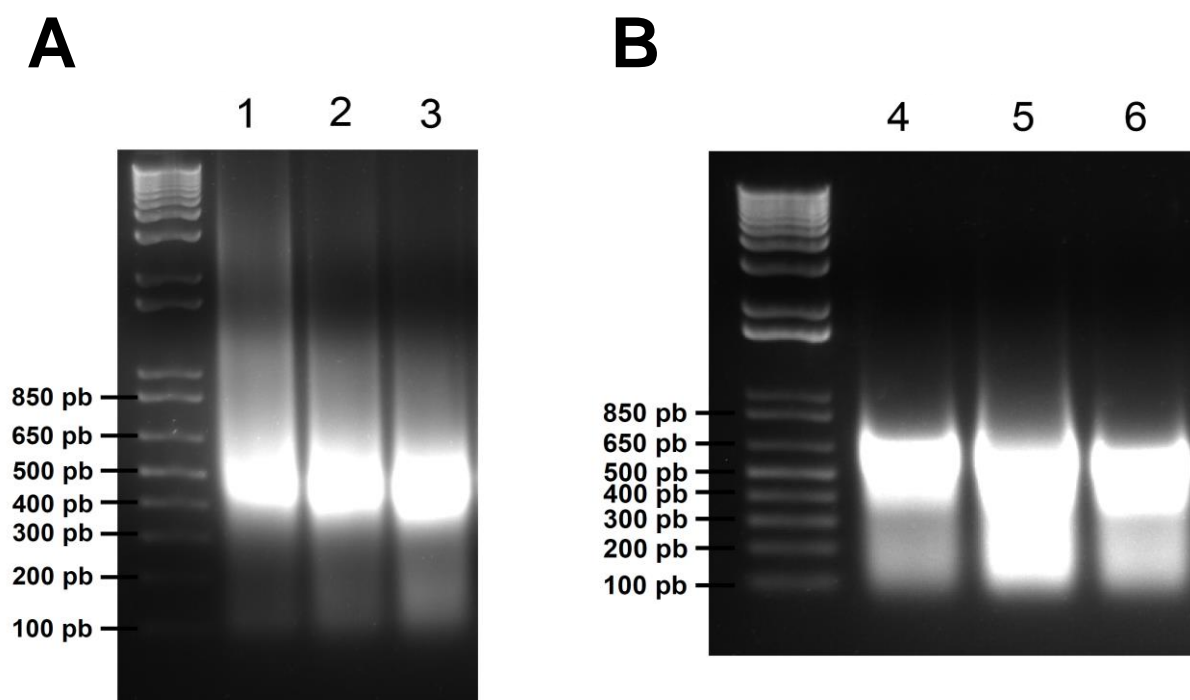


Figura 8: Estabelecimento do protocolo de sonicação da cromatina em células Raji.

Padrão de peso molecular de 1 kb. **(A)** Sonicador *Ultrasonic Processor*, intensidade de 50%, 20×10^6 células. **Linha 1)** 5 pulsos de 15 segundos cada, com 90 segundos de intervalo entre cada pulso. **2)** 10 pulsos de 15 segundos cada, com 90 segundos de intervalo entre cada pulso. **Linha 3)** 15 pulsos de 15 segundos cada, com 90 segundos de intervalo entre cada pulso. **(B)** Sonicador Diagenode, Bioruptor® 300, intensidade máxima. **Linha 4)** 20×10^6 células, 30 pulsos de 30 segundos cada, com 30 segundos de intervalo entre cada pulso. **Linha 5)** 40×10^6 células, 30 pulsos de 30 segundos cada, com 30 segundos de intervalo entre cada pulso. **Linha 6)** 20×10^6 células, 40 pulsos de 30 segundos cada, com 30 segundos de intervalo entre cada pulso.

Após a sonicação da cromatina, a metodologia de ChIP foi realizada de acordo com o protocolo detalhado na seção de Materiais e Métodos. O fator de transcrição NFAT1 foi imunoprecipitado em células Raji estimuladas com PMA e Ionomicina (α -NFAT1). A imunoprecipitação de histona H4 acetilada foi utilizada como controle positivo de imunoprecipitação (α -H4ac). Como controle negativo, a cromatina não foi tratada com qualquer anticorpo (Sem anticorpo). Como controle positivo de carregamento, foi separado 5% da amostra (INPUT) antes da adição dos anticorpos de interesse. Ao final do protocolo de ChIP, o DNA foi purificado e quantificado com o auxílio de um espectrofotômetro (Tabela 1). Os resultados indicam que quantidades muito baixas de DNA imunoprecipitado foram obtidas para as amostras Sem anticorpo, α -NFAT1 e α -H4ac. Esse resultado era esperado uma vez que a quantidade de cromatina imunoprecipitada em experimentos de ChIP é baixa e menor do que a capacidade de detecção de espectrofotômetros. Contudo, foi obtida uma quantidade de aproximadamente 60 ng/ μ L de INPUT. Finalmente, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose do INPUT para se verificar o tamanho da cromatina fragmentada após a extração do DNA. O resultado indica que o tamanho da cromatina está maioritariamente entre 300 a 500 pares de base, de acordo com o esperado (Figura 9).

Tabela 1: Quantificação do DNA resultante da imunoprecipitação de cromatina (ChIP). Os valores indicados representam a média \pm desvio padrão das concentrações de DNA (ng/ μ L) obtidas de 3 experimentos independentes.

Amostra (n=3)	[DNA] Média \pm Desvio (ng/μL)
Sem Anticorpo	3.5 \pm 0.3
α -H4ac	4.1 \pm 0.3
α -NFAT1	5.1 \pm 0.3
INPUT	61.4 \pm 0.3

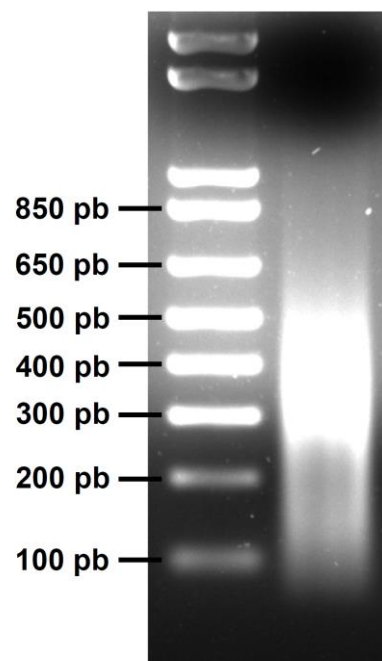
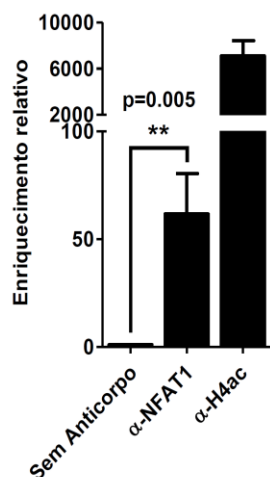


Figura 9: Perfil da cromatina fragmentada utilizada no experimento de imunoprecipitação de cromatina (ChIP). Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em tampão TAE 1x do controle de carregamento (INPUT) após purificação pelo Kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen). Padrão de peso molecular de 1Kb.

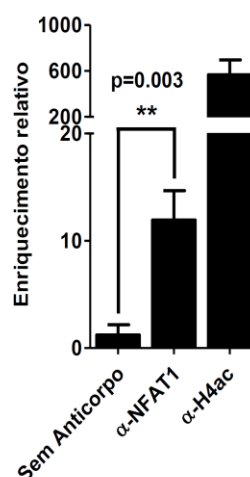
Finalmente, foi realizado o PCR em tempo real do DNA imunoprecipitado em cada uma das condições detalhadas acima para se verificar se, de facto, o NFAT1 é capaz de se ligar aos promotores humanos de CCNE1 e CCNE2. A imunoprecipitação de histona H4 acetilada (α -H4ac, controle positivo) demonstrou a capacidade de recuperação da cromatina dos promotores de Ciclina E1 e E2, indicando que a técnica de ChIP está a funcionar com eficiência (Figura 10A-D, α -H4ac). Os resultados de PCR em tempo real indicam que a cromatina está mais acessível no promotor de Ciclina E1 (Figura 10A-B, α -H4ac) do que no promotor de Ciclina E2 (Figura 10C-D, α -H4ac), uma vez que os pares de *primers* do promotor de hCCNE1 são capazes de detetar a imunoprecipitação de histona H4 acetilada em uma escala 100 x maior no promotor de hCCNE1 (Figura 10A-B, α -H4ac) em relação ao promotor de hCCNE2 (Figura 10C-D, α -H4ac). Os controles negativos apresentaram imunoprecipitação reduzida, possivelmente, referente a imunoprecipitação inespecífica da cromatina. Em relação ao promotor proximal de hCCNE1 foi verificada a imunoprecipitação de NFAT1 associado à região abrangida tanto pelo par de *primer* 1 (Figura 10A, α -NFAT1), como pelo par de *primer* 2 (Figura 10B, α -NFAT1), embora a imunoprecipitação de NFAT1 detetada pelo par de *primer* 1 tenha apresentado uma maior eficiência. Esses resultados indicam que o fator de transcrição NFAT1 foi capaz de se ligar na região entre as posições -869 a -616 pb, possivelmente nos sítios -829, -765, -752 e -677 pb. Quanto ao promotor proximal de hCCNE2, apenas é observada uma diferença significativa entre a imunoprecipitação de NFAT1 e o controle negativo quando se utiliza o par de *primer* 2 (Figura 10D, α -NFAT1), indicando que o NFAT1 foi capaz de se ligar na região entre as posições -696 a -522 pb, onde estão localizados os sítios -695 e -658 pb.

A

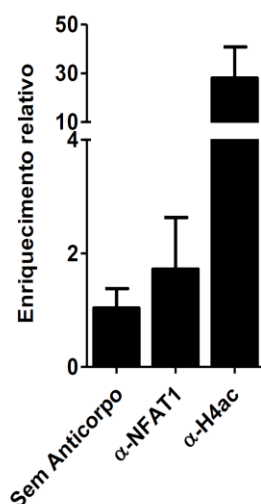
Promotor de hCCNE1 – Par de Primer 1

**B**

Promotor de hCCNE1 – Par de Primer 2

**C**

Promotor de hCCNE2 – Par de Primer 1

**D**

Promotor de hCCNE2 – Par de Primer 2

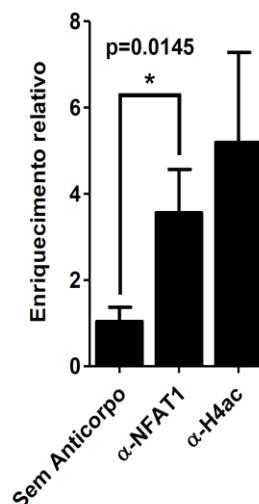


Figura 10: Capacidade de interação de NFAT1 e histona H4 acetilada nos promotores humanos de Ciclina E1 e E2 em células Raji. **(A-D)** Enriquecimento da cromatina imunoprecipitada com NFAT1 (α -NFAT1) e Histona H4 acetilada (α -H4ac) em relação ao controle negativo (Sem Anticorpo). Os promotores de hCCNE1 e de hCCNE2 foram analisados por PCR em tempo real com os pares de *primers* descritos nos Materiais e Métodos. **(A)** Promotor de hCCNE1, par de *primer* 1. **(B)** Promotor de hCCNE1, par de *primer* 2. **(C)** Promotor de hCCNE2, par de *primer* 1. **(D)** Promotor de hCCNE2, par de *primer* 2. Os valores de enriquecimento relativo representam a média das triplicatas das reações de PCR em cada uma das condições normalizadas pelo controle negativo. As barras de erro representam o desvio padrão. Os asteriscos indicam os níveis de significância da imunoprecipitação de cromatina com NFAT1 (α -NFAT1) em relação ao controle negativo (* $p < 0.05$; ** $p \leq 0.005$).

5. Discussão

O fator de transcrição NFAT1 foi capaz de se ligar ao promotor proximal de Ciclina E1 e E2 humana em células Raji estimuladas com PMA e Ionomicina, indicando que, possivelmente, NFAT1 regula diretamente a transcrição de ambos os genes. As análises bioinformáticas dos promotores proximais de hCCNE1 e hCCNE2 indicaram seis sítios putativos de ligação para NFAT. Para Ciclina E1 nenhum dos seis sítios apresenta a sequência consenso de ligação para fatores de transcrição da família NFAT (5'- GGAAA - 3'), tendo todos os sítios uma variação no último nucleotídeo. Já para a Ciclina E2 todos os seis sítios de ligação de NFAT apresentam a sequência consenso. A proteína NFAT nem sempre se liga a um alvo através da sequência consenso [27]. A literatura, por exemplo, mostra cinco diferentes sítios de ligação de NFAT no promotor de IL-2 nas posições -280, -160, -135, -90 e -45 pb). Alguns sítios de ligação identificados são consenso e outros, não [93]. A variação de nucleotídeos na sequência consenso pode interferir na afinidade de ligação de NFAT, tornando a intensidade de ligação mais ou menos forte.

Os fatores de transcrição da família NFAT são capazes de se ligar a diversos outros promotores, como por exemplo NFAT1 se liga à região promotora de CDK4 e reprime a sua expressão [83]. Já o fator de transcrição NFAT2 se liga diretamente ao promotor proximal de c-myc e sobrerregula a sua transcrição [94]. As proteínas NFAT podem formar dímeros e atuar sozinhas na regulação transcripcional, ou podem interagir com diferentes fatores de transcrição. Um dos principais parceiros de NFAT é o fator de transcrição AP-1, uma proteína ativadora composta pelo heterodímero Fos/Jun. Ambos os fatores de transcrição atuam sinergicamente através da interação entre a via de ativação de Cálcio, que ativa os fatores de transcrição NFAT, e as vias que ativam a proteína cinase C (PKC), que regula o fator de transcrição AP-1 [30]. Foi determinado um sítio putativo de ligação do AP-1 (5'- AGTCA -3') no promotor de hCCNE1 na posição - 819 pb (dado não mostrado), próximo a um dos sítios putativos que NFAT1 foi capaz de se ligar (posição -829 pb do promotor de hCCNE1), sugerindo que ambos os fatores de transcrição podem estar a atuar juntos nessa região.

Além do AP-1, NFAT pode se associar a outros fatores de transcrição. Foi demonstrado que a indução da atividade de IL-31 é aumentada com a combinação de NFAT1 ou NFAT2 com a proteína STAT6, em células T e em mastócitos [7]. O fator de transcrição NFAT também se associa à proteína GATA e ambos se ligam ao promotor de IL-5, em mastócitos [95]. Também foi mostrado que a expressão de NFAT1 inibe a atividade basal da atividade do promotor de CDK4 humana [83].

Para cada promotor de Ciclina E humana foram desenhados quatro pares de *primers*. Os dois pares de *primers* mais próximos do início de transcrição não resultaram em um produto de PCR em nenhum dos dois promotores de Ciclina E. Uma possibilidade para a ausência de amplificação está no fato da região do genoma em questão ser muito rica em GC. A ligação entre esses dois nucleotídeos é muito estável, pois é feita por três pontes de hidrogênio, enquanto que a ligação entre AT é efetuada apenas por duas [96]. No início da reação de PCR em tempo real a temperatura de desnaturação está elevada. Quando esta diminui, para que haja anelamento dos primers, há um favorecimento do reanelamento da cadeia dupla do DNA. O anelamento dos primers é dificultada pela competição da ligação estável de GC. A amplificação do DNA nessa região pode não ter ocorrido também devido à sonicação, que pode ter fragmentado a cromatina especificamente na região que seria amplificada pelos *primers* em questão. Outra possível explicação pode ser a temperatura de anelamento e/ou extensão da reação de PCR em tempo real que pode não ter sido a mais indicada para os referidos pares de *primers*. Contudo, os dois pares de *primers* mais *upstream* nos dois promotores de Ciclina E geraram produtos de PCR com tamanhos esperados, permitindo verificar o papel do fator de transcrição NFAT1 na regulação da Ciclina E nos dois promotores.

Foi demonstrado, neste projeto, através da técnica de imunoprecipitação de cromatina, que NFAT1 se liga na região entre as posições -869 a -616 pb do promotor de Ciclina E1, possivelmente nos sítios -829, -765, -752 e -677 pb e na região entre as posições -696 a -522 pb do promotor de Ciclina E2, onde estão localizados os sítios -695 e -658 pb, em células Raji estimuladas (Figura 10, α -NFAT1). A acetilação de histona H4 foi utilizada como controle positivo de imunoprecipitação porque é uma modificação pós-traducional frequentemente presente em histonas e indica acessibilidade da cromatina. A acetilação de histonas pode influenciar a estrutura da cromatina de diversas formas. Primariamente, essa modificação pode funcionar como um sinal para a ligação de proteínas e bloquear a função de remodeladores de cromatina [97]. A capacidade de imunoprecipitar a histona H4 acetilada foi muito maior do que a de imunoprecipitar NFAT1 em ambos os promotores de Ciclina E (Figura 10, α -H4ac e α -NFAT1). Isso ocorre porque a ligação de histona H4 existe em maior quantidade do que o fator de transcrição NFAT1 no DNA. Os resultados de imunoprecipitação de histona H4 acetilada sugerem que o promotor de Ciclina E1 é mais acessível do que o promotor de Ciclina E2 em células Raji estimuladas, já que histona H4 acetilada foi imunoprecipitada em maior quantidade no promotor de Ciclina E1 (Figura 10, α -H4ac). Isto pode ser explicado pelo fato da presença de Ciclina E1 ser mais prevalente que Ciclina E2 e corroborado pelos dados do grupo que indicam que a Ciclina E1 é mais expressa do que Ciclina E2 em linfócitos B [92].

Os dados demonstrados pelo grupo revelam que a deficiência de NFAT1 provoca hiperproliferação de linfócitos B primários murinos estimulados com estímulos policlonais, como PMA e Ionomicina ou anti-BCR (figura 4). Isto mostra que NFAT1, possivelmente, funciona como repressor do ciclo celular em linfócitos B e pode contribuir para controlar a tumorigênese. Na verdade, trabalhos efetuados em células B demonstram que a deficiência em NFAT1/NFAT4 provoca um aumento no número de células B foliculares maduras [98]. Além disso, o nosso grupo mostrou que a deficiência em NFAT1 leva à superexpressão de RNA mensageiro de Ciclina E1 e E2 em células Raji estimuladas, sugerindo que NFAT1 controla negativamente a expressão de Ciclina E a nível transcricional (figura 5). De fato, alguns estudos mostraram que a deficiência em NFAT1 provoca o aumento não só de Ciclina E, mas também de outras ciclinas. Um estudo mostrou que a ausência de NFAT1 leva ao aumento de expressão de Ciclina A2 em linfócitos T e que NFAT1 é capaz de se ligar a um sítio de ligação *consenso* do promotor de Ciclina A2 murino e reprimir a sua expressão [53]. Os resultados do ensaio de Luciferase feitos pelo nosso grupo corroboram os dados deste trabalho uma vez que mostram que NFAT1 regula a expressão dos promotores de hCCNE1 e hCCNE2. O conjunto de resultados indica que NFAT1 se liga ao promotor de Ciclina E e regula negativamente a sua expressão, ou seja, NFAT1 funciona como um repressor de Ciclina E em linfócitos B.

Está extensamente descrito na literatura que a família de fatores de transcrição NFAT controla, também, a atividade de diversos outros promotores de genes envolvidos no ciclo celular, como por exemplo, NFAT1 reprime diretamente a expressão da cinase dependente de Ciclina, CDK4 em linfócitos T [83] e induz a expressão do inibidor de CDK, p21^{WAF1/CIP1} [87], funcionando assim como um repressor da proliferação. Contudo, nem todos os membros da família NFAT desempenham a mesma função durante a regulação do ciclo celular. A proteína NFAT2, por sua vez, parece ser um ativador do ciclo celular. A sua expressão aumentada em células NIH3T3 levou à perda da inibição de crescimento por contato e, por sua vez, à proliferação celular [99].

Na verdade, a família dos fatores de transcrição NFAT tem sido associada não só com a regulação de genes que controlam o ciclo celular, mas também com a diferenciação celular. Por exemplo, no caso das células *naive T helper* (Th) as proteínas NFAT regulam a transcrição de IL-4 o que vai determinar se a célula vai se diferenciar em Th1 ou em Th2 [100]. A ausência de NFAT1 também induz o crescimento e a diferenciação desordenada de células do tecido cartilaginoso [101]. Em relação ao NFAT2, animais com deficiência nessa proteína possuem linfócitos T e B com proliferação comprometida e dificuldade na repopulação de órgãos linfóides [102]. Além disso, o fator de transcrição NFAT está envolvido com genes que regulam a apoptose em

diferentes tipos celulares, por exemplo, TNF- α [44] e BCL-2 [102] sugerindo um envolvimento destes fatores de transcrição na manutenção da fisiologia celular e no processo de transformação celular. Outro papel importante do NFAT é na progressão do tumor. As proteínas NFAT1 e NFAT5 são expressas em carcinomas ductais da mama invasivos humanos e o aumento da sua atividade promove a migração e invasão de linhas celulares derivadas de carcinomas do cólon e da mama humanos [103]. Entender a contribuição específica de cada membro da família dos fatores de transcrição NFAT na progressão do ciclo celular e nos mecanismos pelos quais eles atuam, vai ajudar a providenciar uma melhor compreensão futura sobre a tumorigênese. Encontrar novos alvos moleculares que contribuem para a tumorigênese linfocitária é de suma importância uma vez que pode ajudar a gerar o desenvolvimento de possíveis novos alvos para a manipulação terapêutica em pacientes com doenças linfoproliferativas.

6. Conclusão e Perspectivas Futuras

Para concluir, este trabalho propõe que o fator de transcrição NFAT1 regula diretamente a expressão dos genes de Ciclina E humanos em células Raji por se ligar diretamente na região entre as posições -869 a -616 pb do promotor de Ciclina E1 e na região entre as posições -696 a -522 pb do promotor de Ciclina E2. Estes dados, juntamente com os dados do grupo, sugerem que NFAT1 reprime a expressão de Ciclina E, reprimindo a progressão do ciclo celular em linfócitos B. Os resultados de imunoprecipitação de Histona H4 acetilada sugerem ainda que o promotor de Ciclina E1 é mais acessível do que o promotor de Ciclina E2 em linfócitos B ativados.

O conjunto de dados sugere que NFAT1 funciona como um repressor do ciclo celular em células B. Logo, a sua perda de função pode vir a contribuir para a perda de controle do ciclo celular e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de linfomas deste tipo celular. Assim a sua atividade pode funcionar como um novo e eficaz alvo de terapia para linfomas de células B. Sendo assim, futuramente, sugere-se que se estude melhor o mecanismo celular envolvido com a atividade repressora deste fator de transcrição, a fim de que este seja utilizado com uma possível abordagem terapêutica em linfomas de células B.

7. Referências

- [1] A. K. Abbas and C. A. Janeway, "Immunology: improving on nature in the twenty-first century.," *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 129–138, 2000.
- [2] W. F. Lim, T. Inoue-Yokoo, K. S. Tan, M. Lai, and D. Sugiyama, "Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells.," *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 4, no. 3, p. 71, 2013.
- [3] P. T. and M. W. Murphy Kenneth, "Innate Immunity : The First Lines of Defense," *Janeway's Immunobiol.*, pp. 37–73, 2011.
- [4] R. Medzhitov and C. A. Janeway Jr., "Innate immunity: impact on the adaptive immune response," *Curr Opin Immunol*, vol. 9, no. 1, pp. 4–9, 1997.
- [5] J. M. Vyas, A. G. Van der Veen, and H. L. Ploegh, "The known unknowns of antigen processing and presentation.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8, no. 8, pp. 607–18, 2008.
- [6] R. Medzhitov, "TOLL-LIKE RECEPTORS AND INNATE IMMUNITY," vol. 1, no. November, 2001.
- [7] K. Park, J.-H. Park, W.-J. Yang, J.-J. Lee, M.-J. Song, and H.-P. Kim, "Transcriptional activation of the IL31 gene by NFAT and STAT6," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 91, no. 2, pp. 245–257, 2012.
- [8] J. B. Chung, M. Silverman, and J. G. Monroe, "Transitional B cells: Step by step towards immune competence," *Trends Immunol.*, vol. 24, no. 6, pp. 342–348, 2003.
- [9] M.-I. Yuseff, P. Pierobon, A. Reversat, and A.-M. Lennon-Duménil, "How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 13, no. 7, pp. 475–86, 2013.
- [10] T. KIYOSHI, "Cytokines Involved in B-Cell Differentiation and Their Sites of Action," *Proc Soc Exp Biol Med*, vol. 215, pp. 121–133.
- [11] R. Asokan, N. K. Banda, G. Szakonyi, X. S. Chen, and V. M. Holers, "Human complement receptor 2 (CR2/CD21) as a receptor for DNA: Implications for its roles in the immune response and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE)," *Mol. Immunol.*, vol. 53, no. 1–2, pp. 99–110, 2013.
- [12] D. C. Parker, "T cell-dependent B cell activation.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 11, pp. 331–60, 1993.
- [13] B. A. Heesters, R. C. Myers, and M. C. Carroll, "Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 14, no. 7, pp. 495–504, 2014.
- [14] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of Cancer : The Next Generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011.
- [15] M. J. Smyth, G. P. Dunn, and R. D. Schreiber, "Cancer Immunosurveillance and Immunoediting: The Roles of Immunity in Suppressing Tumor Development and Shaping Tumor Immunogenicity," *Adv. Immunol.*, vol. 90, no. 06, pp. 1–50, 2006.
- [16] F. M. Burnet, "The Concept of Immunological Surveillance," vol. 13, pp. 1–27, 1970.
- [17] R. A. Gatti and R. A. Good, "Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases: A literature review," *Cancer*, vol. 28, no. 1, pp. 89–98, 1971.

- [18] K. Salavoura, A. Kolialexi, G. Tsangaris, and A. Mavrou, "Development of cancer in patients with primary immunodeficiencies," *Anticancer Res.*, vol. 28, no. 2 B, pp. 1263–1269, 2008.
- [19] S. J. Kinlen LJ, Webster AD, Bird AG, Haile R, Peto J, "Prospective study of cancer in patients with hypogammaglobulinaemia," *Lancet*, pp. 263–266, 1985.
- [20] B. Mueller and P. Pizzo, "Cancer in children with primary or secondary immunodeficiencies," *J. Pediatr.*, vol. 126, no. January, pp. 1–10, 1995.
- [21] G. M. Clifford, J. Polesel, M. Rickenbach, L. D. Maso, O. Keiser, A. Kofler, E. Rapiti, F. Levi, G. Jundt, T. Fisch, A. Bordoni, D. De Weck, S. Franceschi, M. Battegay, E. Bernasconi, J. Böni, H. Bucher, P. Bürgisser, S. Cattacin, M. Cavassini, R. Dubs, M. Egger, L. Elzi, P. Erb, K. Fantelli, M. Fischer, M. Flepp, A. Fontana, P. Francioli, H. Furrer, M. Gorgievski, H. Günthard, B. Hirschel, L. Kaiser, C. Kind, T. Klimkait, B. Ledergerber, U. Lauper, M. Opravil, F. Paccaud, G. Pantaleo, L. Perrin, J. C. Piffaretti, C. Rudin, P. Schmid, J. Schüpbach, R. Speck, A. Telenti, A. Trkola, P. Vernazza, R. Weber, and S. Yerly, "Cancer risk in the Swiss HIV cohort study: Associations with immunodeficiency, smoking, and highly active antiretroviral therapy," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 97, no. 6, pp. 425–432, 2005.
- [22] S. A. Birkeland, H. H. Storm, L. U. Lamm, L. Barlow, I. Blohme, B. Forsberg, B. Eklund, O. Fjeldborg, M. Friedberg, and L. Frodin, "Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986.," *Int. J. cancer*, vol. 60, no. 2, pp. 183–189, 1995.
- [23] W. H. Fridman, F. Pagès, C. Sautès-Fridman, and J. Galon, "The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 12, no. 4, pp. 298–306, 2012.
- [24] J. Galon, A. Costes, F. Sanchez-Cabo, A. Kirilovsky, B. Mlecnik, C. Lagorce-Pagès, M. Tosolini, M. Camus, A. Berger, P. Wind, F. Zinzindohoué, P. Bruneval, P.-H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W.-H. Fridman, and F. Pagès, "Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome.," *Science*, vol. 313, no. 5795, pp. 1960–4, 2006.
- [25] F. Garrido, F. Ruiz-Cabello, T. Cabrera, J. J. Pérez-Villar, M. López-Botet, M. Duggan-Keen, and P. L. Stern, "Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours," *Immunol. Today*, vol. 18, no. 2, pp. 89–95, 1997.
- [26] A. A. Alizadeh, M. B. Eisen, R. E. Davis, C. Ma, I. S. Lossos, a Rosenwald, J. C. Boldrick, H. Sabet, T. Tran, X. Yu, J. I. Powell, L. Yang, G. E. Marti, T. Moore, J. Hudson, L. Lu, D. B. Lewis, R. Tibshirani, G. Sherlock, W. C. Chan, T. C. Greiner, D. D. Weisenburger, J. O. Armitage, R. Warnke, R. Levy, W. Wilson, M. R. Grever, J. C. Byrd, D. Botstein, P. O. Brown, and L. M. Staudt, "Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling.," *Nature*, vol. 403, no. 6769, pp. 503–11, 2000.
- [27] A. Rao, C. Luo, and P. Hogan, "Transcription factors of the NFAT family: regulation and function.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 15, pp. 707–747, 1997.
- [28] G. R. Crabtree, "Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT.," *Cell*, vol. 96, no. 5, pp. 611–4, 1999.
- [29] C. Lopez-Rodríguez, J. Aramburu, A. S. Rakeman, and A. Rao, "NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 13, pp. 7214–9, 1999.

- [30] F. Macián, C. López-Rodríguez, and A. Rao, "Partners in transcription: NFAT and AP-1," *Oncogene*, vol. 20, no. 19, pp. 2476–2489, 2001.
- [31] C. Luo, E. Burgeon, J. A. Carew, P. G. McCaffrey, T. M. Badalian, W. S. Lane, P. G. Hogan, and A. Rao, "Recombinant NFAT1 (NFATp) is regulated by calcineurin in T cells and mediates transcription of several cytokine genes," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 16, no. 7, pp. 3955–3966, 1996.
- [32] L. Chen, J. N. Glover, P. G. Hogan, A. Rao, and S. C. Harrison, "Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA.," *Nature*, vol. 392, no. 6671, pp. 42–48, 1998.
- [33] F. Macian, "NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 5, no. 6, pp. 472–84, 2005.
- [34] J. P. Shaw, P. J. Utz, D. B. Durand, J. J. Toole, E. a Emmel, and G. R. Crabtree, "Identification of a putative regulator of early T cell activation genes.," *Science*, vol. 241, no. 4862, pp. 202–205, 1988.
- [35] J. P. B. Viola, L. D. S. Carvalho, B. P. F. Fonseca, and L. K. Teixeira, "NFAT transcription factors: From cell cycle to tumor development," *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, vol. 38, no. 3, pp. 335–344, 2005.
- [36] G. P. Mognol, P. S. De Araujo-Souza, B. K. Robbs, L. K. Teixeira, and J. P. B. Viola, "Transcriptional regulation of the c-Myc promoter by NFAT1 involves negative and positive NFAT-responsive elements," *Cell Cycle*, vol. 11, no. 5, pp. 1014–1028, 2012.
- [37] J. P. Northrop, S. N. Ho, L. Chen, D. J. Thomas, L. a Timmerman, G. P. Nolan, A. Admon, and G. R. Crabtree, "NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation," *Nature*, vol. 369, no. 6480, pp. 497–502, 1994.
- [38] S. L. Peng, A. J. Gerth, A. M. Ranger, and L. H. Glimcher, "NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation," *Immunity*, vol. 14, no. 1, pp. 13–20, 2001.
- [39] G. R. Crabtree and E. N. Olson, "NFAT signaling: Choreographing the social lives of cells," *Cell*, vol. 109, no. 2 SUPPL. 1, pp. 67–79, 2002.
- [40] T. Hoey, Y.-L. Sun, K. Williamson, and X. Xu, "Isolation of two new members of the NF-AT gene family and functional characterization of the NF-AT proteins," *Immunity*, vol. 2, pp. 461–472, 1995.
- [41] E. S. Masuda, Y. Naito, H. Tokumitsu, D. D. Campbell, F. Saito, C. Hannum, K. Arai, and N. Arai, "NFATx, a novel member of the nuclear factor of activated T cells family that is expressed predominantly in the thymus.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 15, no. 5, pp. 2697–706, 1995.
- [42] A. Kiani, A. Rao, and J. Aramburu, "Manipulating Immune Responses with Immunosuppressive Agents that Target NFAT," *Immunity*, vol. 12, no. 4, pp. 359–372, 2000.
- [43] P. G. Hogan, P. G. Hogan, L. Chen, and L. Chen, "Transcriptional regulation by calcium, calcineurin," *NFAT. Genes Dev.*, vol. 17, no. 18, pp. 2205–2232, 2003.
- [44] P. G. McCaffrey, A. E. Goldfeld, and A. Rao, "The role of NFATp in cyclosporin A-sensitive tumor necrosis factor- α gene transcription," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 48, pp. 30445–30450, 1994.
- [45] K. M. Latinis, L. a Norian, S. L. Eliason, and G. a Koretzky, "Two NFAT

- transcription factor binding sites participate in the regulation of CD95 (Fas) ligand expression in activated human T cells,” *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 50, pp. 31427–31434, 1997.
- [46] J. Rengarajan, P. R. Mittelstadt, H. W. Mages, A. J. Gerth, R. A. Kroczeck, J. D. Ashwell, and L. H. Glimcher, “Sequential involvement of NFAT and Egr transcription factors in FasL regulation,” *Immunity*, vol. 12, no. 3, pp. 293–300, 2000.
 - [47] S. Chuvpilo, E. Jankevics, D. Tyrsin, A. Akimzhanov, D. Moroz, M. K. Jha, J. Schulze-Luehrmann, B. Santner-Nanan, E. Feoktistova, T. Konig, A. Avots, E. Schmitt, F. Berberich-Siebelt, A. Schimpl, and E. Serfling, “Autoregulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis,” *Immunity*, vol. 16, no. 6, pp. 881–895, 2002.
 - [48] B. K. Robbs, P. I. Lucena, and J. P. B. Viola, “The transcription factor NFAT1 induces apoptosis through cooperation with Ras/Raf/MEK/ERK pathway and upregulation of TNF- α expression,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1833, no. 8, pp. 2016–2028, 2013.
 - [49] M. Oukka, I. C. Ho, F. Charles De La Brousse, T. Hoey, M. J. Grusby, and L. H. Glimcher, “The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cells,” *Immunity*, vol. 9, no. 3, pp. 295–304, 1998.
 - [50] W. T. Pu, Q. Ma, and S. Izumo, “NFAT transcription factors are critical survival factors that inhibit cardiomyocyte apoptosis during phenylephrine stimulation in vitro,” *Circ. Res.*, vol. 92, no. 7, pp. 725–731, 2003.
 - [51] J. W. Neal and N. A. Clipstone, “A constitutively active NFATC1 mutant induces a transformed phenotype in 3T3-L1 fibroblasts,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 19, pp. 17246–17254, 2003.
 - [52] T. a Zaichuk, E. H. Shroff, R. Emmanuel, S. Filleur, T. Nelius, and O. V Volpert, “Nuclear factor of activated T cells balances angiogenesis activation and inhibition,” *J. Exp. Med.*, vol. 199, no. 11, pp. 1513–1522, 2004.
 - [53] L. D. S. Carvalho, L. K. Teixeira, N. Carrossini, A. T. N. Caldeira, K. M. Ansel, A. Rao, and J. P. B. Viola, “The NFAT1 transcription factor is a repressor of cyclin A2 gene expression,” *Cell Cycle*, vol. 6, no. 14, pp. 1789–1795, 2007.
 - [54] M. R. Müller and A. Rao, “NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 10, no. 9, pp. 645–656, 2010.
 - [55] C. Norbury and P. Nurse, “Animal cell cycles and their control,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 61, pp. 441–70, 1992.
 - [56] J. Pines, “Cyclins and Cyclin-Dependent Kinases,” *Adv. Cancer Res.*, vol. 66, pp. 181–212, 1995.
 - [57] S. V. Ekholm and S. I. Reed, “Regulation of G1 cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 12, no. 6, pp. 676–684, 2000.
 - [58] C. J. Sherr, “G1 phase progression: Cycling on cue,” *Cell*, vol. 79, no. 4, pp. 551–555, 1994.
 - [59] H. C. Hwang and B. E. Clurman, “Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles,” *Oncogene*, vol. 24, no. 17, pp. 2776–2786, 2005.
 - [60] M. Erlanson, C. Portin, B. Linderholm, J. Lindh, G. Roos, and G. Landberg, “Expression of cyclin E and the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in malignant

- lymphomas-prognostic implications," *Blood*, vol. 92, no. 3, pp. 770–777, 1998.
- [61] A. Koff, F. Cross, A. Fisher, J. Schumacher, K. Leguellec, M. Philippe, and J. M. Roberts, "Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family," *Cell*, vol. 66, no. 6, pp. 1217–1228, 1991.
 - [62] D. J. Lew, V. Dulic, and S. I. Reed, "Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (cln) function in yeast," *Cell*, vol. 66, no. 6, pp. 1197–1206, 1991.
 - [63] N. Lauper, a R. Beck, S. Cariou, L. Richman, K. Hofmann, W. Reith, J. M. Slingerland, and B. Amati, "Cyclin E2: a novel CDK2 partner in the late G1 and S phases of the mammalian cell cycle.," *Oncogene*, vol. 17, no. 20, pp. 2637–43, 1998.
 - [64] J. M. Gudas, M. Payton, S. Thukral, E. Chen, M. Bass, M. O. Robinson, and S. Coats, "Cyclin E2, a novel G1 cyclin that binds Cdk2 and is aberrantly expressed in human cancers.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 19, no. 1, pp. 612–622, 1999.
 - [65] M. Zariwala, J. Liu, and Y. Xiong, "Cyclin E2, a novel human G1 cyclin and activating partner of CDK2 and CDK3, is induced by viral oncoproteins.," *Oncogene*, vol. 17, no. 21, pp. 2787–98, 1998.
 - [66] C. E. Caldon and E. a Musgrove, "Distinct and redundant functions of cyclin E1 and cyclin E2 in development and cancer.," *Cell Div.*, vol. 5, p. 2, 2010.
 - [67] F. Girard, U. Strausfeld, a Fernandez, and N. J. Lamb, "Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts.," *Cell*, vol. 67, no. 6, pp. 1169–1179, 1991.
 - [68] D. H. Walker and J. L. Maller, "Role for cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication.," *Nature*, vol. 354, pp. 314–317, 1991.
 - [69] R. W. King, P. K. Jackson, and M. W. Kirschner, "Mitosis in transition," *Cell*, vol. 79, no. 4, pp. 563–571, 1994.
 - [70] M. Arellano and S. Moreno, "Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 29, no. 4, pp. 559–573, 1997.
 - [71] M. Serrano, G. J. Hannon, and D. Beach, "A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4.," *Nature*, vol. 366, no. 6456, pp. 704–707, 1993.
 - [72] G. J. Hannon and D. Beach, "p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest.," *Nature*, vol. 371, no. 6494, pp. 257–61, 1994.
 - [73] K. Guan, C. W. Jenkins, Y. Li, M. A. Nichols, X. Wu, C. L. O. Keefe, A. G. Matera, and Y. Xiong, "Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function," pp. 2939–2952, 1994.
 - [74] H. Hirai, M. F. Roussel, J. Y. Kato, R. A. Ashmun, and C. J. Sherr, "Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 15, no. 5, pp. 2672–81, 1995.
 - [75] F. K. Chan, J. Zhang, L. Cheng, D. N. Shapiro, and A. Winoto, "Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 15, no. 5, pp. 2682–8, 1995.
 - [76] K. Polyak, J. Kato, M. J. Solomon, C. J. Sherr, J. Massague, J. M. Roberts, and A. Koff, "p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming Growth Factor-13 and

Contact Inhibition To Cell Cycle Arrest," pp. 9–22, 1994.

- [77] J. W. Harper, S. J. Elledge, K. Keyomarsi, B. Dynlacht, L. H. Tsai, P. Zhang, S. Dobrowolski, C. Bai, L. Connell-Crowley, and E. Swindell, "Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 6, no. 4, pp. 387–400, 1995.
- [78] M. Lee, I. Reynisdttir, and J. Massagu, "Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution," vol. 9, pp. 639–649, 1995.
- [79] H. Hochegger, S. Takeda, and T. Hunt, "Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 9, no. 11, pp. 910–916, 2008.
- [80] L. Lipskaia and A. M. Lompré, "Alteration in temporal kinetics of Ca²⁺ signaling and control of growth and proliferation," *Biol. Cell*, vol. 96, no. 1, pp. 55–68, 2004.
- [81] M. Tomono, K. Toyoshima, M. Ito, and H. Amano, "Calcineurin is essential for DNA synthesis in Swiss 3T3 fibroblasts," *Biochem J*, vol. 317 (Pt 3, pp. 675–680, 1996.
- [82] M. S. Caetano, A. Vieira-de-Abreu, L. K. Teixeira, M. B. F. Werneck, M. A. Barcinski, and J. P. B. Viola, "NFATC2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocyte activation: evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression.," *FASEB J.*, vol. 16, no. 14, pp. 1940–2, 2002.
- [83] S. Baksh, H. R. Widlund, a a Frazer-Abel, J. Du, S. Fosmire, D. E. Fisher, J. a DeCaprio, J. F. Modiano, and S. J. Burakoff, "NFATc2-mediated repression of cyclin-dependent kinase 4 expression," *Mol Cell*, vol. 10, no. 5, pp. 1071–1081, 2002.
- [84] S. Xanthoudakis, J. P. B. Viola, K. T. Y. Shaw, C. Luo, J. D. Wallace, P. T. Bozza, and T. Curran, "An enhanced immune response in mice lacking the transcription Factor NFAT1," vol. 272, no. May, 1996.
- [85] M. R. Hodge, A. M. Ranger, F. C. De La Brousse, T. Hoey, M. J. Grusby, and L. H. Glimcher, "Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice," *Immunity*, vol. 4, no. 4, pp. 397–405, 1996.
- [86] S. Baksh, J. a DeCaprio, and S. J. Burakoff, "Calcineurin regulation of the mammalian G0/G1 checkpoint element, cyclin dependent kinase 4.," *Oncogene*, vol. 19, no. 24, pp. 2820–7, 2000.
- [87] M. P. Santini, C. Talora, T. Seki, L. Bolgan, and G. P. Dotto, "Cross talk among calcineurin, Sp1/Sp3, and NFAT in control of p21(WAF1/CIP1) expression in keratinocyte differentiation.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 17, pp. 9575–80, 2001.
- [88] V. Horsley and G. K. Pavlath, "Prostaglandin F2a stimulates growth of skeletal muscle cells via an NFATC2-dependent pathway," *J. Cell Biol.*, vol. 161, no. 1, pp. 111–118, 2003.
- [89] B. K. Robbs, A. L. S. Cruz, M. B. F. Werneck, G. P. Mognol, and J. P. B. Viola, "Dual roles for NFAT transcription factor genes as oncogenes and tumor suppressors.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 28, no. 23, pp. 7168–7181, 2008.
- [90] L. V. Pham, A. T. Tamayo, L. C. Yoshimura, Y. C. Lin-Lee, and R. J. Ford, "Constitutive NF- κ B and NFAT activation in aggressive B-cell lymphomas synergistically activates the CD154 gene and maintains lymphoma cell survival," *Blood*, vol. 106, no. 12, pp. 3940–3947, 2005.

- [91] L. Fu, Y. C. Lin-Lee, L. V. Pham, A. Tamayo, L. Yoshimura, and R. J. Ford, "Constitutive NF- κ B and NFAT activation leads to stimulation of the BLyS survival pathway in aggressive B-cell lymphomas," *Blood*, vol. 107, no. 11, pp. 4540–4548, 2006.
- [92] L. K. Teixeira, N. Carrossini, C. Sécca, J. E. Kroll, D. C. DaCunha, D. V. Faget, L. D. S. Carvalho, S. J. de Souza, and J. P. B. Viola, "NFAT1 transcription factor regulates cell cycle progression and cyclin E expression in B lymphocytes," *Cell Cycle*, vol. 15, no. 17, pp. 2346–2359, 2016.
- [93] J. W. Rooney, T. Hoey, and L. H. Glimcher, "Coordinate and cooperative roles for NF-AT and AP-1 in the regulation of the murine IL-4 gene," *Immunity*, vol. 2, no. 5, pp. 473–483, 1995.
- [94] M. Buchholz, A. Schatz, M. Wagner, P. Michl, T. Linhart, G. Adler, T. M. Gress, and V. Ellenrieder, "Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway.," *EMBO J.*, vol. 25, no. 15, pp. 3714–3724, 2006.
- [95] E. E. Prieschl, V. Gouilleux-Gruart, C. Walker, N. E. Harrer, and T. Baumruker, "A nuclear factor of activated T cell-like transcription factor in mast cells is involved in IL-5 gene regulation after IgE plus antigen stimulation.," *J. Immunol.*, vol. 154, no. 11, pp. 6112–9, 1995.
- [96] P. Yakovchuk, E. Protozanova, and M. D. Frank-Kamenetskii, "Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix," *Nucleic Acids Res.*, vol. 34, no. 2, pp. 564–574, 2006.
- [97] T. Suganuma and J. L. Workman, "Signals and combinatorial functions of histone modifications.," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 80, pp. 473–499, 2011.
- [98] D. N. Samanta, A. Palmetshofer, D. Marinkovic, T. Wirth, E. Serfling, and L. Nitschke, "B Cell Hyperresponsiveness and Expansion of Mature Follicular B Cells but Not of Marginal Zone B Cells in," *J. Immunol.*, vol. 174, pp. 4797–4802, 2005.
- [99] P. I. Lucena, D. V Faget, E. Pachulec, M. C. Robaina, C. E. Klumb, B. K. Robbs, and J. P. B. Viola, "NFAT2 isoforms differentially regulate gene expression, cell death, and transformation through alternative N-Terminal Domains," vol. 36, no. 1, pp. 119–131, 2016.
- [100] C. M. Porter and N. a Clipstone, "Sustained NFAT signaling promotes a Th1-like pattern of gene expression in primary murine CD4⁺ T cells.," *J. Immunol.*, vol. 168, no. 10, pp. 4936–4945, 2002.
- [101] A. M. Ranger, L. C. Gerstenfeld, J. Wang, T. Kon, H. Bae, E. M. Gravallese, M. J. Glimcher, and L. H. Glimcher, "The nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor NFATp (NFATc2) is a repressor of chondrogenesis.," *J. Exp. Med.*, vol. 191, no. 1, pp. 9–22, 2000.
- [102] A. M. Ranger, M. Oukka, J. Rengarajan, and L. H. Glimcher, "Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development.," *Immunity*, vol. 9, no. 5, pp. 627–635, 1998.
- [103] S. Jauliac, C. López-Rodríguez, L. M. Shaw, L. F. Brown, A. Rao, and A. Toker, "The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 4, no. 7, pp. 540–544, 2002.